

Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Professor Dr. K. Brand

Ischämie und Mitochondrienfunktion
Aktivität des Wasserstofftransportes
über den Malat/Aspartat-Zyklus
in Rattenlebermitochondrien
unter variablen Ischämiebedingungen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Matthias Baumann
aus Erlangen

1907



Aus dem Institut für Physiologische Chemie
der Universität Erlangen - Nürnberg

Direktor: Professor Dr. K. Brand

Ischämie und Mitochondrienfunktion
Aktivität des Wasserstofftransportes
über den Malat/Aspartat-Zyklus
in Rattenlebermitochondrien
unter variablen Ischämiebedingungen

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Matthias Baumann
aus Erlangen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf

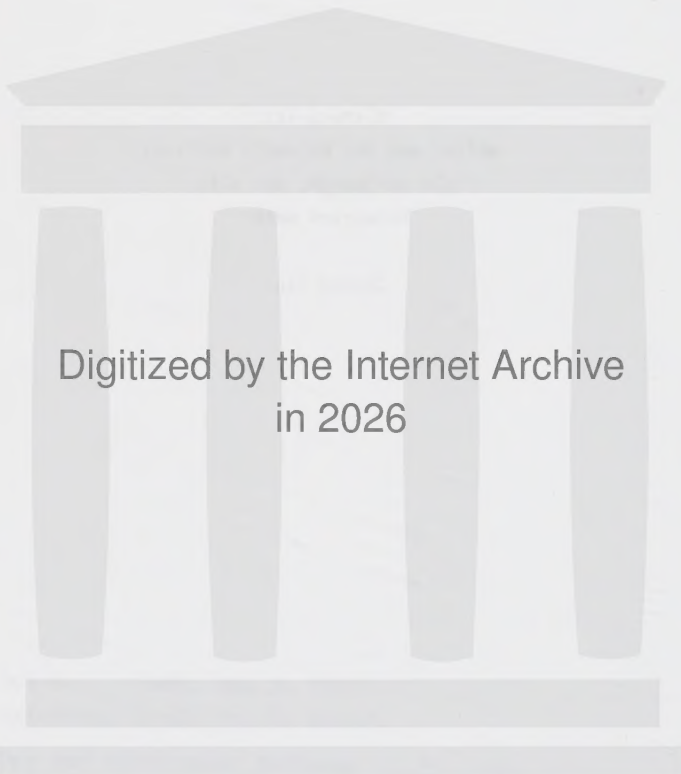
Referent: Prof. Dr. K. Brand

Tag der mündlichen Prüfung: 02.07.1984

Niemand ist
weiter von der Wahrheit entfernt
als derjenige, der alle
Antworten weiß.

Chuang Tsu

meinen Eltern gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung und Problemstellung	1
2.	Materialien und Methoden	4
2.1.	Versuchstiere	4
2.2.	Reagentien	4
2.3.	Narkose - Ischämie - Leberpräparation - Chlorpromazinapplikation	6
2.4.	Präparation der Lebermitochondrien	7
2.5.	Proteinbestimmung	9
2.6.	Untersuchung der Mitochondrienfunktion	11
2.6.1.	Sauerstoffmessung	12
2.6.1.1.	Definition des Zustandes der mitochon- drialen Atmung	12
2.6.1.2.	Meßelektrode	13
2.6.1.3.	Durchführung der Sauerstoffverbrauchs- messung	15
2.6.1.4.	Funktionsparameter der Sauerstoffver- brauchsmessung	18
2.6.2.	Wasserstoffshuttle über den Malat/Aspartat- Zyklus	20
2.6.2.1.	Messung der Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus	22
2.6.2.2.	Kinetik des Wasserstoffshuttle über den Malat/Aspartat-Zyklus	25
2.6.2.3.	Funktionsparameter der Wasserstoffshuttle- Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus	27
2.7.	Statistische Methoden	29
3.	Ergebnisse	31
3.1.	Einfluß der Ischämie auf Sauerstoffverbrauchs- raten und Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus in Rattenlebermitochondrien	31

3.1.1.	Sauerstoffverbrauchsrate in Abhängigkeit von der Ischämie bei 37 °C und 4 °C	31
3.1.2.	Die Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus	35
3.2.	Einfluß der Ischämie auf die Permeabilität der Mitochondrienmembran	38
3.2.1.	NAD-Permeabilität der Mitochondrienmembran	38
3.2.2.	Oxalacetat-Permeabilität der Mitochondrienmembran ("Q")	38
3.3.	Untersuchungen zum Mechanismus der ischämischen Schädigung der Rattenlebermitochondrien	41
3.3.1.	Einfluß von Chlorpromazin auf die ischämiebedingten Funktionsstörungen in Rattenlebermitochondrien	41
3.3.2.	Einfluß von Calcium auf die Funktion und Membranpermeabilität von Rattenlebermitochondrien aus Kontrolltieren (0 min Ischämie)	44
3.3.3.	Einfluß von Na-Oleat auf die Funktion und Membranpermeabilität von Rattenlebermitochondrien aus Kontrolltieren (0 min Ischämie)	46
4.	Diskussion	49
4.1.	Einfluß der Ischämie auf die Sauerstoffverbrauchsrate und die Aktivität des Wasserstoffshuttle über den Malat/Aspartat-Zyklus	49
4.2.	Einfluß der Ischämie auf die Permeabilität der Mitochondrienmembran	52
4.3.	Untersuchungen zum Mechanismus der ischämischen Schädigung der Rattenlebermitochondrien	53
5.	Zusammenfassung	64
6.	Anhang	67
7.	Literaturverzeichnis	73

Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AOA	Aminoacetoacetat
ATP	Adosintriphosphat
2,4 - DNP	2,4 - Dinitrophenol
EDTA	Ethylendiamin-Tetra-Essigsäure
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Riboflavin-5'-Phosphat
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
LDH	Laktatdehydrogenase
MDH	Malatdehydrogenase
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvatkinase
RCR	Respiratory-Control-Ratio (Atmungskontrollquotient)
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan

1. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Ischämie, d.h. die mangelnde bzw. ganz aufgehobene Blutversorgung eines Organs oder Gewebes, stellt eine schwerwiegende Noxe dar, die in allen Bereichen der Medizin klinische Bedeutung hat.

Krankheitsbilder mit ischämischen Folgezuständen sind z.B. der Herzinfarkt, der apoplektische Insult und der hypovolämische Schock, um nur einige zu nennen. Auch bei der heute mehr und mehr angewandten Methode der Organtransplantation spielt das Problem der Ischämie eine große Rolle.

Obwohl die Pathogenese dieser Schädigung bereits seit geraumer Zeit Gegenstand weltweiter Forschung ist, sind die grundlegenden molekularen Vorgänge, denen dabei die entscheidende Bedeutung zukommt, noch nicht vollständig aufgeklärt.

Es herrscht weitgehende Übereinstimmung darüber, daß neben anderen Zellorganellen, vor allem dem Mitochondrium eine ausschlaggebende Rolle bei der Schädigung der Zelle infolge einer Ischämie zukommt.

(1 ; 2 ; 3 ; 4)

Das Mitochondrium ist ein Organell, in dem die für die Lebensfunktionen und Aufrechterhaltung der Integrität der Zelle notwendige Energie bereitgestellt wird. Die bei der stufenweisen Oxidation von Substratwasserstoff mit Hilfe der an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Enzyme der Atmungskette freiwerdende Energie wird durch Phosphorylierung von ADP zu ATP als chemische Energie konserviert.

ATP stellt den Energielieferanten für praktisch alle endergonen Zellfunktionen dar.

Für diesen Vorgang der oxidativen Phosphorylierung ist eine ständige, ausreichende Versorgung des Mitochondriums mit Reduktionsäquivalenten und Sauerstoff essentiell. Wird diese z.B. durch eine in dem betreffenden Organ ausgelöste Ischämie unterbrochen, so ist das Organell nicht mehr in der Lage, die erforderliche Energiemenge bereitzustellen. Es kommt demzufolge zu einer Reihe von Schädigungen, sowohl des Mitochondriums als auch der Zelle mit entsprechenden Funktionseinschränkungen bis hin zum Zelltod.



Die Art und das Ausmaß, sowie die mögliche Verhinderung dieser ischämischen Schäden wurden bereits auf vielfältige Weise anhand von Lebermitochondrien untersucht.

So wiesen mehrere Forscher auf einen mehr oder weniger vollständigen Verlust der Atmungskontrolle hin. (5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 9 ; 10 ; 11) Es wurde von einer Abnahme des ATP-Spiegels berichtet (12), sowie von einer gesteigerten Lipolyse in der Membran (8 ; 13), einer Zunahme der Permeabilität der Membran für bestimmte Ionen und Moleküle (6 ; 10 ; 13) und von einer elektronenmikroskopisch erkennbaren Anschwellung der Mitochondrien bzw. Veränderungen in deren Ultrastruktur (5 ; 6). Festgestellt wurde ferner eine Veränderung des Gehaltes an Intermediaten des mitochondrialen Stoffwechsels (7 ; 12) und die Änderung der Aktivität mitochondrialer Enzyme (6 ; 13).

Es wurde die protektive Wirkung bestimmter Agentien, wie z.B. Rinderserumalbumin (5 ; 8 ; 11) und Chlorpromazin (6 ; 13) untersucht, sowie der Einfluß verschiedener Ischämiebedingungen (5) und der Effekt der Reperfusion des betreffenden Organs (6 ; 7). Dabei war es meist von besonderem Interesse, die Umstände näher zu charakterisieren, die zu einer Irreversibilität der ischämischen Schädigung führen. (5 ; 6 ; 7 ; 8 ; 11 ; 13)

Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Wirkung verschiedener Ischämietemperaturen auf die Funktion von Rattenlebermitochondrien ohne Reperfusion des Organs. Weiterhin wurde die Wirkung von Chlorpromazin auf die ischämischen Schädigungen der Mitochondrienfunktion in Abhängigkeit von der Dosierung des Pharmakons geprüft.

Als Meßgröße wurde hierbei die bis jetzt nur bei der Untersuchung von altersabhängigen Funktionsstörungen des Mitochondriums (14) verwandte Aktivität des Wasserstoffshuttle über den Malat/Aspartat-Zyklus herangezogen. Weiterhin wurden die Sauerstoffverbrauchsraten in den verschiedenen Stadien mitochondrialer Atmung (15), der Atmungskontrollquotient (16), sowie die Veränderungen der Permeabilität der Mitochondrienmembran für bestimmte Moleküle gemessen.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen bei guter Korrelation des neu untersuchten Parameters der Wasserstoffshuttle-Aktivität mit der bekannten ischämiebedingten Einschränkung der Atmungsfunktion, daß die Wasserstoffeinschleußung in Rattenlebermitochondrien nach einer Ischämiedauer von 40 min bei 37 °C erheblich eingeschränkt ist.

Dagegen ruft die gleiche Ischämiedauer bei einer Ischämietemperatur von 4 °C nur relativ geringe Veränderungen der Mitochondrienfunktion hervor. Eine Vorbehandlung mit Chlorpromazin hat bei einer Ischämiedauer von 40 min bei 37 °C ohne Reperfusion des Organs keinen protektiven Effekt auf die Mitochondrienfunktion.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Forschungsvorhabens im Rahmen dessen die Mitochondrienfunktion in Abhängigkeit von der Ischämiedauer und den Ischämiebedingungen in den Organen Hirn, Herz, Leber und Niere von Ratten unterschiedlichen Lebensalters untersucht wurde.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Versuchstiere

Es wurden ausschließlich männliche Sprague Dawley Ratten der Firma Dr. Ivanovas GmbH, Kisslegg/Allgäu verwendet. Das Gewicht der Tiere betrug jeweils 200g bis 250g, was einem Alter von 8 bis 12 Wochen entspricht. Gefüttert wurde mit Altromin Standard Diät Ratten/Mäuse Nr. 1320 und Leitungswasser ad libitum.

2.2. Reagentien

Für alle Messungen wurden im Handel erhältliche, für biochemische Zwecke geeignete Enzyme und Reagentien mit dem notwendigen Reinheitsgrad verwendet.

Von der Firma Bayer AG, Leverkusen:

Chlorpromazin (Megaphen^R)

Von der Firma Boehringer, Mannheim:

Alkoholdehydrogenase ($8800 \text{ U} \times \text{ml}^{-1}$)

ADP

Glutamat-Oxalacetat-Transaminase ($2000 \text{ U} \times \text{ml}^{-1}$)

Laktatdehydrogenase ($5500 \text{ U} \times \text{ml}^{-1}$)

Malatdehydrogenase ($6000 \text{ U} \times \text{ml}^{-1}$)

NADH

Phosphoenolpyruvat

Pyruvatkinase ($2000 \text{ U} \times \text{ml}^{-1}$)

Trichloressigsäure

Von der Firma ICN-K&K Laboratories, New York:

Rotenone

Von der Firma E. Merck, Darmstadt:

Äpfelsäure (Malat)

Äthanol (absolut)

Bernsteinsäure (Succinat)

Calciumchlorid (CaCl_2)

Diäthyläther

Glutaminsäure (Glutamat)

Glycin

Kaliumchlorid (KCl)

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

Kupfer-II-Sulfat (CuSO_4)

Mannitol

Magnesiumsulfat (MgSO_4)

Natrium-Kalium-Tartrat

Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

Natriumpyrophosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$)

Saccharose

Von der Firma C. Roth, Karlsruhe:

K-EDTA

Semicarbazid (hydrochlorid)

Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (= Tris)

Von der Firma Serva, Heidelberg:

Asparaginsäure (Aspartat)

2,4 - Dinitrophenol

Von der Firma Sigma Chemical Company, St. Louis U.S.A.:

Aminooxiacetat (AOA)

Carnitin (hydrochlorid)

Na-Oleat

2.3. Narkose - Ischämie - Leberpräparation - Chlorpromazinapplikation

Nach dem Wiegen wurde das Versuchstier in einem geschlossenen Behälter (Volumen ca. 33 l) mit ca. 20 ml Diäthyläther bis zum Erreichen des Toleranzstadiums betäubt. (Kontrolle: Muskeltonus stark herabgesetzt; Cornealreflex nicht mehr auslösbar) Die hierzu benötigte Äthermenge und dessen Einwirkungsdauer waren individuell etwas unterschiedlich. Das narkotisierte Tier wurde auf einen speziellen Präpariertisch gebracht und das Fortdauern der Narkosetiefe durch einen mit Diäthyläther getränkten Papierstreifen, der über Mund- und Nasenöffnung der Ratte gelegt wurde, gewährleistet.

Die Leber wurde durch einen das Abdomen großflächig eröffnenden Medialschnitt und einen anschließenden Transversalschnitt unterhalb des rechten Rippenbogens dargestellt. Nun erfolgte die Durchtrennung sämtlicher zu- und abführenden Gefäße, sowie die Ablösung des Organs von seiner Verwachsung mit der dorsalen Bauchwand. Anschließend wurde die so exstirpierte Leber sofort in eiskalte Präparationslösung (4 °C) überführt. Sodann wurde der Thorax durch Spaltung des Sternums eröffnet und das Tier durch einen Schnitt in die Herzkammer getötet.

Das bisher beschriebene Vorgehen entspricht der Forderung nach ischämiefreier Präparation. (Kontrolltiere)

Sollte eine Ischämie im untersuchten Organ provoziert werden, so wurde zunächst, wie oben beschrieben, ein Schnitt in die Herzkammer ausgeführt und damit ein Kreislaufstillstand, also eine Ischämie in allen abhängigen Organen, herbeigeführt. Je nach gewünschten Ischämiebedingungen wurde dann wie folgt verfahren:

- a) Das Tier wurde in einem Plastikbeutel verpackt und 40 min bei 37 °C in ein Temperierbad (Exatherm U3 electronic, der Firma Julabo Labortechnik) gelegt. Anschließend wurde die Leber, wie oben beschrieben, präpariert.
- b) Die Leber wurde gemäß obiger Beschreibung extirpiert und sofort in einen mit eiskalter Präparationslösung (4 °C) vorgespülten Plastikbeutel verpackt und dieser 40 min in Eiswasser (4 °C) gelegt.

Sollte die Wirkung von Chlorpromazin unter Ischämiebedingungen untersucht werden, so wurde dem Versuchstier die entsprechende Dosis des Pharmakons intraperitoneal injiziert und nach einer Einwirkungsdauer zwischen 30 min und 120 min ein Kreislaufstillstand durch Herzschnitt hervorgerufen. Anschließend wurde, wie unter a) beschrieben, verfahren.

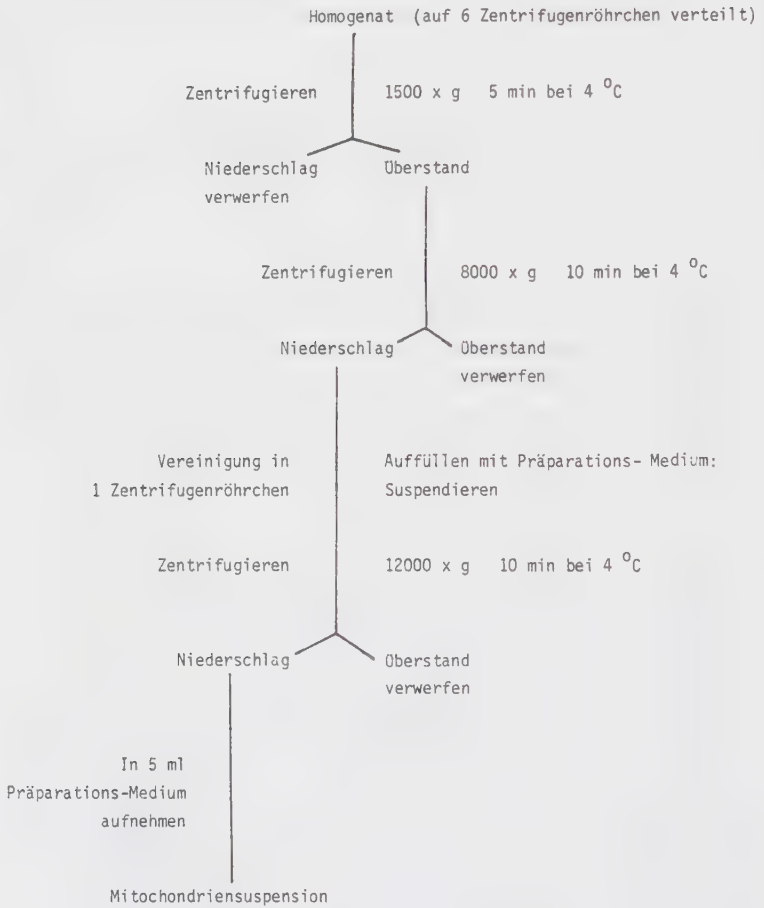
2.4. Präparation der Lebermitochondrien

Die Präparation erfolgte, mit einigen Modifikationen, nach der von Schneider (17) bzw. von Lehninger und Cooper (18) angegebenen Methode. Alle hierbei erforderlichen Schritte erfolgten entweder im Kühlraum oder unter Eiskühlung.

Die extirpierte Leber wurde sofort in eiskalte Präparationslösung gebracht und von Blut und Gerinnungsprodukten gereinigt. Nun wurde das Organ mit einer Schere sehr fein zerkleinert und sein Volumen durch Verdrängung in 5 ml Präparationslösung bestimmt. (Das Lebergewicht betrug durchschnittlich 7 g - 9 g) Anschließend wurde das Volumen auf 15 ml aufgefüllt und mit einem vorgekühlten Glas-Teflon-Homogenisator nach Potter-Elvehjem mit 500 Umdrehungen $\times \text{min}^{-1}$ durch achtmaliges vollständiges Auf- und Abbewegen des Glaszylinders homogenisiert.

Das so gewonnene Homogenat wurde nun mit Präparationslösung aufgefüllt, so daß das Endvolumen dem fünffachen Gesamtgewicht der Leber entsprach. Daraufhin wurde das so aufgefüllte und gut gemischte Homogenat gleichmäßig auf sechs vorgekühlte Zentrifugenröhrchen ($\hat{=}$ 12 ml) verteilt

Abb. 1 : Schematische Darstellung der Mitochondrienpräparation



und in der auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge (Cryofuge 20-3, der Firma Heraeus Christ; Rotor 08780) einer fraktionierten Zentrifugation unterworfen. (siehe Schema Abb. 1 S. 8)

Zusammensetzung des verwendeten Präparationsmediums:

Saccharose	250 mM
Tris	10 mM
K-EDTA	0,5 mM
pH 7,4 (eingestellt mit HCl)	

Sollte die Wirkung von Na-Oleat bzw. von CaCl_2 auf die nicht ischämischen Mitochondrien aus Kontrolltieren untersucht werden, so wurden entsprechende Mengen dieser Reagentien unmittelbar nach der fraktionierten Zentrifugation zur Mitochondriensuspension pipettiert (siehe Tabelle 6 S. 45) und bei 4 °C jeweils 10 min inkubiert. Anschließend wurden die so vorbehandelten Mitochondrien zu den entsprechenden Messungen herangezogen.

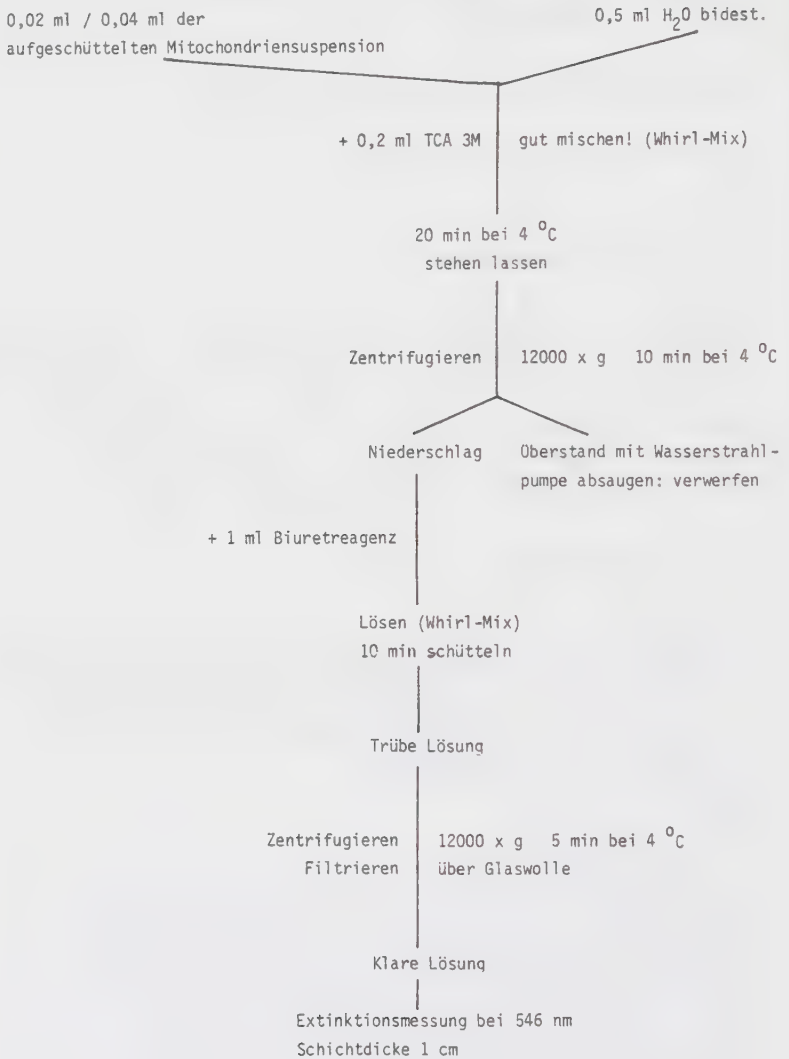
2.5. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration als relatives Maß für den Mitochondriengehalt der Mitochondriensuspension wurde nach der Biuretmethode, modifiziert nach Weichselbaum (19), bestimmt. Das Vorgehen ist auf der Abb. 2 S. 10 dargestellt. Zur Messung des Leerwertes diente das Biuret-Reagenz. Zusammensetzung des Biuret-Reagenz:

CuSO_4	6 mM
Na-K-Tartrat	21 mM
in 10 %iger NaOH	

Als Besonderheit ergab sich, daß der in Biuret-Reagenz aufgenommene Niederschlag der ersten Zentrifugation, wahrscheinlich infolge unspezifischer Lipidverunreinigungen, eine diffuse Trübung zeigte. Um eine für die Extinktionsmessung geeignete klare Lösung zu erhalten, mußte noch eine weitere hochtourige Zentrifugation angeschlossen werden, durch die es zu einem Absetzen der Verunreinigungen an der Oberfläche

Abb. 2 : Schematische Darstellung der Proteinbestimmung



der Lösung kam. Diese konnte dann ohne Schwierigkeiten durch eine Filtrierung durch Glaswolle entfernt werden.

Berechnung: Für die Proteinkonzentration c ($\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$) der Mitochondriensuspension gilt:

$$c = \frac{E_{546}}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{v_o}{v_p}$$

E_{546} : Extinktion bei 546 nm

ϵ : Extinktionskoeffizient = $0,277 \text{ ml} \times \text{mg}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

d : Schichtdicke in cm

v_o : Testvolumen in ml

v_p : Probenvolumen in ml

Für die Extinktionsmessungen wurde das Zweistrahlsspektralphotometer DM4 der Firma C. Zeiss, Oberkochen benutzt.

2.6. Untersuchung der Mitochondrienfunktion

Die Funktion der Mitochondrien in Abhängigkeit von der Ischämiedauer und der Ischämietemperatur wurde im wesentlichen durch die Messung der Sauerstoffverbrauchsrate mit den Substraten Malat und Succinat, sowie der Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus bestimmt. Als weitere Funktionsparameter wurden noch die NAD-Permeabilität und die Oxalacetat-Permeabilität ("Q") der Mitochondrienmembran untersucht. Zur Klärung der eingangs beschriebenen Fragestellung wurden folgende Versuchsserien durchgeführt:

- 1) 6 Versuche ohne Ischämie (Kontrolle)
- 2) 6 Versuche mit einer Ischämiedauer von 40 min bei einer Ischämietemperatur von 37°C
- 3) 6 Versuche mit einer Ischämiedauer von 40 min bei einer Ischämietemperatur von 4°C
- 4) 4 Versuche mit einer Ischämiedauer von 40 min bei einer Ischämietemperatur von 37°C , wobei die Versuchstiere mit variablen Dosen Chlorpromazin vorbehandelt wurden.

- 5) 3 Versuche mit Mitochondrien aus Kontrolltieren, wobei der jeweiligen Mitochondriensuspension variable Mengen CaCl_2 zugesetzt wurden.
- 6) 3 Versuche mit Mitochondrien aus Kontrolltieren, wobei der jeweiligen Mitochondriensuspension variable Mengen Na-Oxal zugesetzt wurden.

2.6.1. Sauerstoffmessung

Zur Messung der Sauerstoffverbrauchsrate wurden die Mitochondrien mit der Substraten Malat bzw. Succinat bei 35°C inkubiert und dabei wurde fortlaufend die Sauerstoffkonzentration im Inkubationsansatz bestimmt.

2.6.1.1. Definition des Zustandes der mitochondrialen Atmung

Chance und Williams haben 1955 folgende Zustände mitochondrialer Atmung ("states") definiert, 15 %, auf die im weiteren Text Bezug genommen wird:

	state 1	state 2	state 3	state 4	state 5
Charakteristikum	aerob	aerob	aerob	aerob	anaerob
ADP-Spiegel	niedrig	hoch	hoch	niedrig	hoch
Substrat-Spiegel	niedrig	fast null	hoch	hoch	hoch
	(endogen)				
Atmungsrate	langsam	langsam	schnell	langsam	null
limitierende Komponente	Protonat-akzeptor	Substrat	Atmungskette	Protonat-akzeptor	Sauerstoff

"state 3" wird auch aktivierter und "state 4" kontrollierter Zustand genannt.

2.6.1.2. MeBelektrode

Die SauerstoffmeBelektrode Hansatech, bezogen von der Firma Bachhofer, Reutlingen (siehe Abb. 3 S. 14), reduziert geringe Mengen Sauerstoff aus dem Inkubationsmedium. Die dabei fließende Stromstärke ist der Sauerstoffkonzentration im Inkubationsraum proportional und wird mit Hilfe eines Potentiometerschreibers (Servogor 310 der Firma Goerz Elektro GmbH, Wien) linear gegen die Zeit aufgetragen.

Zur Eichung der Skala dient der Nullwert nach Reduktion des gesamten Sauerstoffes durch einen Überschuß des Reduktionsmittels Natriumdithionit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), sowie der Sättigungswert für Sauerstoff in Wasser bei 25 °C. ($253 \text{ nmol O}_2 \times \text{ml}^{-1}$ (20))

Das Inkubationsmedium wird dabei ständig von einem Magnetrührer durchmischt, um eine Sauerstoffverarmung in der Nähe der Kathode zu verhindern. Ein von einem Thermostaten gespeister Wassermantel um den eigentlichen Inkubationsraum herum sorgt für eine gleichmäßige Temperatur von 25 °C. Die beiden Elektroden sind durch eine gesättigte KCl-Lösung leitend verbunden und vom Inkubationsraum durch eine sauerstoffpermeable Teflonmembran getrennt.

Wird der Inkubationsraum mit Inkubationsmedium gefüllt, so stellt sich nach einigen Minuten eine konstante Stromstärke in dem oben beschriebenen Stromkreis ein, welche der Sauerstoffmenge, die pro Zeiteinheit durch die Teflonmembran permeiert und an der Kathode reduziert wird, proportional ist: Der Schreiber zeichnet eine horizontal verlaufende Gerade auf.

Werden nun Mitochondrien, die ihrerseits Sauerstoff verbrauchen, in den Inkubationsraum gebracht, so treten diese mit der reduzierenden Kathode in Konkurrenz um den vorhandenen Sauerstoff. Folglich diffundieren pro Zeiteinheit weniger Sauerstoffmoleküle durch die Trennmembran und werden an der Kathode reduziert: Die Stromstärke sinkt proportional ab und der Schreiber zeichnet eine proportional abfallende Kurve auf, deren Steigung ein Maß für den Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien ist.

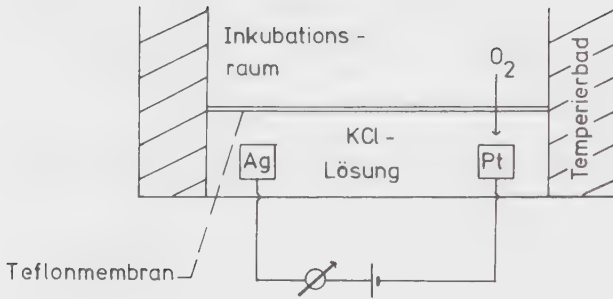


Abb. 3 : Schematische Darstellung der Sauerstoffmeßelektrode und der an den Elektroden ablaufenden Vorgänge

2.6.1.3. Durchführung der Sauerstoffverbrauchsmessung (siehe Abb. 4 S. 16)

In das Inkubationsgefäß mit der Meßelektrode wurden nacheinander folgende Lösungen pipettiert und dabei wurde laufend die Sauerstoffkonzentration im Inkubationsansatz gemessen:

- a) Inkubationsmedium (auf 25 °C temperiert) 2,00 ml
(modifiziert nach Clark und Nicklas (21))

Mannitol	225 mM
Saccharose	75 mM
Tris	15 mM
KH_2PO_4	5 mM
K-EDTA	0,05 mM
pH	7,4

- b) Mitochondriensuspension 0,20 ml
(ca. 20 mg Protein $\times \text{ml}^{-1}$; die exakte Konzentration wurde bei jedem Versuch bestimmt)

c) Substrat-Lösungen

aa) Malat/Glutamat	jeweils 0,5 M pH 7,4	je 0,02 ml
bb) Succinat	1,0 M pH 7,4	0,02 ml
+Rotenone	1 mM (in Äthanol gelöst)	0,02 ml

Für jedes Substrat aa) bzw. bb) wurde eine eigene Meßelektrode verwendet.

- d) ADP-Lösung 35 mM pH 7,4 0,015 ml

Rotenone blockiert die Atmungskette zwischen NAD und Ubichinon (22); dadurch kann nur noch Wasserstoff, der über das Coenzym FAD (z.B. von Succinat) einfließt, oxidiert werden, während der Wasserstoff, der über das Cosubstrat NAD einfließt (z.B. von Malat), nicht weiter oxidiert werden kann. Die Zugabe von Rotenone erschien notwendig, weil als Folge

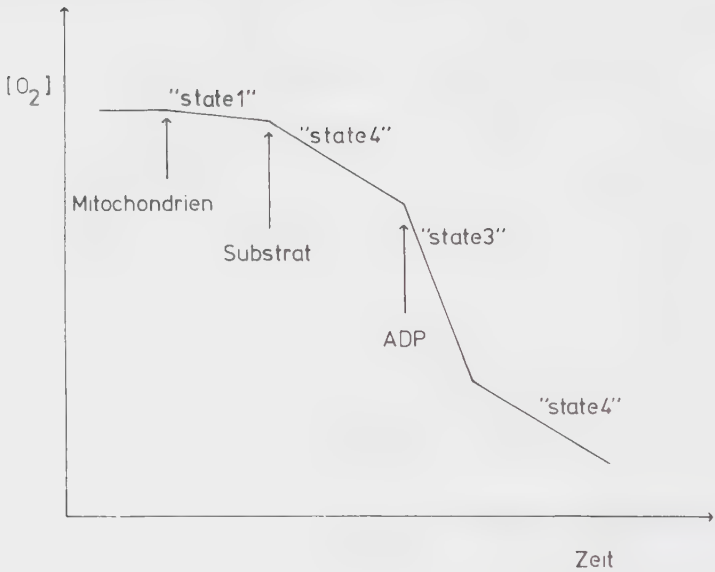


Abb. 4 : Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Sauerstoffkonzentration im Inkubationsraum der Meßanordnung, wie er vom Potentiometerschreiber aufgezeichnet wurde.

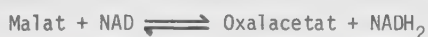
der Succinatmetabolisierung im Citratzyklus Malat entsteht, das seinerseits als Wasserstoffdonator für die Atmungskette fungiert und somit die Meßwerte verfälscht hätte.

Der Umgang mit Rotenone erfordert größte Sorgfalt, da es sich hierbei um eine äußerst giftige pflanzliche Substanz handelt, die teilweise als Insektizid eingesetzt wird (23).

Insbesondere darf die Meßelektrode, in der mit Hilfe von Malat als Substrat der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien gemessen werden soll, auf keinen Fall mit Rotenone kontaminiert werden, da diese Substanz noch in kleinsten Mengen hochwirksam ist und eine sinnvolle Messung infolge der oben erläuterten Hemmung des Wasserstofftransportes unmöglich macht. Zudem gestaltet sich eine aus diesem Grunde notwendige Reinigung der entsprechenden Teile der Meßapparatur außerordentlich schwierig und zeitraubend.

Durch die Zugabe der Mitochondrien beginnt ein langsamer Sauerstoffverbrauch in der Inkubationskammer, der dem "state 1" nach Chance und Williams entspricht.

Die Überführung in "state 4" geschieht durch die Zugabe der entsprechenden Menge der Substrate Malat bzw. Succinat. Der Sauerstoffverbrauch nimmt zu. Bei Verwendung von Malat als Substrat ergibt sich folgende Besonderheit: Malat permeiert die Mitochondrienmembran und reduziert mitochondriales NAD nach der Gleichung:



Da das Gleichgewicht der Reaktion ganz auf der linken Seite der Gleichung liegt, ist es notwendig, gleichzeitig auch Glutamat in den Inkubationsansatz zu geben, um über eine Transaminierung das entstandene Oxalacetat nach folgender Gleichung



aus dem Reaktionsgleichgewicht zu entfernen. Auf diese Weise wird verhindert, daß das Substrat zum begrenzenden Faktor der mitochondrialen

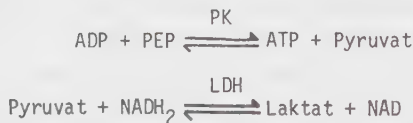
Atmung wird. Eine denkbare Verstoffwechselung von Oxalacetat im Citratzyklus ist aufgrund des Mangels an Acetyl-CoA nicht möglich.

Zugabe von ADP zum Inkubationsansatz bewirkt eine Überführung in "state 3" und eine deutliche Zunahme des Sauerstoffverbrauches intakter Mitochondrien. Die angegebene ADP-Menge ist so bemessen, daß ihr vollständiger Umsatz zu ATP in kurzer Zeit erfolgen kann, wonach der Sauerstoffverbrauch wieder auf die "state 4"-Rate zurückgeht.

Erneuter Zusatz von ADP führt wiederum zu "state 3" und nach seinem vollständigen Umsatz kommt es wieder zur Rückkehr zu "state 4".

Diese zweite Aktivierung der mitochondrialen Atmung wird konventionsgemäß für die Messung der Sauerstoffverbrauchsraten herangezogen.

Es sei noch angemerkt, daß die hergestellte ADP-Lösung durch eine Bestimmung der ADP-Konzentration mit Hilfe des gekoppelten optischen Tests kontrolliert wurde. Durchgeführt wurde die ADP-Messung nach der modifizierten Vorschrift von Adam (24), entsprechend dem Reaktionsschema:



Extinktionsmessung bei 340 nm d = 1 cm

2.6.1.4. Funktionsparameter der Sauerstoffverbrauchsmessung

a) Die Sauerstoffverbrauchsraten in "state 4" und "state 3" lassen sich aus den Sauerstoffmeßkurven entnehmen. Die Steigung der Kurven während des jeweiligen Atmungszustandes entspricht dem Sauerstoffverbrauch pro Zeiteinheit, der noch durch die jeweils eingesetzte Proteinmenge als relatives Maß für die Mitochondrienmenge dividiert wird.

Einheit: $\text{nmol O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$

b) Die "ADP-bedingten Sauerstoffverbrauchsraten" ergeben sich durch Subtraktion der Sauerstoffverbrauchsraten in "state 4" von den in "state 3" gemessenen Sauerstoffverbrauchsraten.

- c) Der Atmungskontrollquotient oder Respiratory-Control-Ratio (RCR) (16) stellt den Quotienten aus den Sauerstoffverbrauchsrate in "state 3" und "state 4" dar. Er gibt eine Information über den Kopplungsgrad der oxidativen Phosphorylierung.
- d) Der P/O-Quotient gibt das Verhältnis von gebildeter ATP-Menge zu der hierfür benötigten Sauerstoffmenge an. Zur Berechnung wurde angenommen, daß die eingesetzte ADP-Menge vollständig zu ATP umgesetzt wird und daß die Sauerstoffverbrauchsrate in "state 4" auch im aktiven Zustand "state 3" nicht für die ATP-Synthese zur Verfügung stehen. Es ergibt sich:

$$P/O = \frac{\text{nmol ADP (umgesetzt zu ATP)}}{\text{nmol ADP-bedingten } O_{2/2} \text{ -Verbrauch}}$$

Aus dieser Gleichung ergibt sich der P/O-Quotient als dimensionslose Größe.

- e) "Q" als Parameter für die Oxalacetat-Permeabilität der Mitochondrienmembran:

Aus der oben erwähnten Besonderheit bei der Verwendung von Malat als Substrat ergibt sich die Möglichkeit, einen weiteren Funktionsparameter zu definieren.

Bringt man in den Inkubationsansatz nur Malat ein, nicht aber Glutamat, so wird man praktisch keine Zunahme der mitochondrialen Atmung feststellen, da es gemäß obiger Beschreibung durch die Akkumulation von Oxalacetat zu einer Produkthemmung der NAD-Reduktion durch Malat kommt. Es wird daher kein in der Atmungskette oxidierbares Reduktionsäquivalent gebildet.

Dies gilt allerdings nur solange wie die Mitochondrienmembran intakt und damit impermeabel für Oxalacetat ist. Wird sie jedoch aufgrund einer (z.B. ischämischen) Schädigung durchlässig für dieses Molekül, so besteht die erwähnte Produkthemmung der NAD-Reduktion nicht mehr, da Oxalacetat jetzt laufend aus dem Mitochondrium in das umgebende Medium entweicht und so aus dem Reaktionsgleichgewicht ent-

hemp wird. Solange die eingesetzte Malat-Menge hierfür ausreicht, kann daher ständig NADH_2 entstehen, welches der Atmungskette zugeführt wird. Das Ausmaß der mitochondrialen Atmung, allein mit Malat als Substrat ohne Zusatz von Glutamat, stellt somit einen Parameter für die Oxalacetat-Permeabilität der Mitochondrienmembran dar. Als Meßgrößen werden dabei jeweils die Sauerstoffverbrauchsrate, die sich bei Verwendung von Malat alleine und in Verbindung mit Glutamat als Substrat ergeben, benutzt. Es gilt:

$$Q = \frac{\text{Sauerstoffverbrauchsrate in "state 3" mit Malat als Substrat}}{\text{Sauerstoffverbrauchsrate in "state 3" mit Malat+Glutamat als Substrat}}$$

In Idealfall der vollständig intakten Membran ergibt sich: $Q = 0$. Steigende Werte von Q sprechen für eine zunehmende Permeabilität für Oxalacetat und damit für eine zunehmende Schädigung der Mitochondrienmembran.

2.6.2. Wasserstoffshuttle über den Malat/Aspartat-Zyklus

Für die Einschleusung von Wasserstoff aus extramitochondrialem NADH_2 , das bei der Katalyse cytosolischer Dehydrogenasen, z.B. der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, entsteht, in das Mitochondrium muß die Existenz eines speziellen Transportsystems gefordert werden, da die intakte Mitochondrienmembran für NAD , NADH impermeabel ist.

Einen solchen Transportmechanismus stellt z.B. der Malat/Aspartat-Zyklus mit seinen Carriersystemen für α -Ketoglutarat/Malat bzw. Glutamat/Aspartat dar. (siehe Abb. 5 S. 21)

Dieses Transportsystem für cytosolische Reduktionsäquivalente (Wasserstoffshuttle) stellt einen empfindlichen Funktionsparameter der Mitochondrien dar. Er steht in funktioneller Verbindung mit der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung.

Medechnisch erfassbar wird der Wasserstoffshuttle durch folgende Überlegung: (siehe Abb. 5 S. 21)

Sobald in den Mitochondrien durch Oxidation von Malat Oxalacetat entsteht und diese nach erfolgter Transaminierung als Aspartat ins Cytosol

WASSERSTOFF - SHUTTLE ÜBER DEN MALAT - ASPARTAT ZYKLUS IN MITOCHONDRIEN

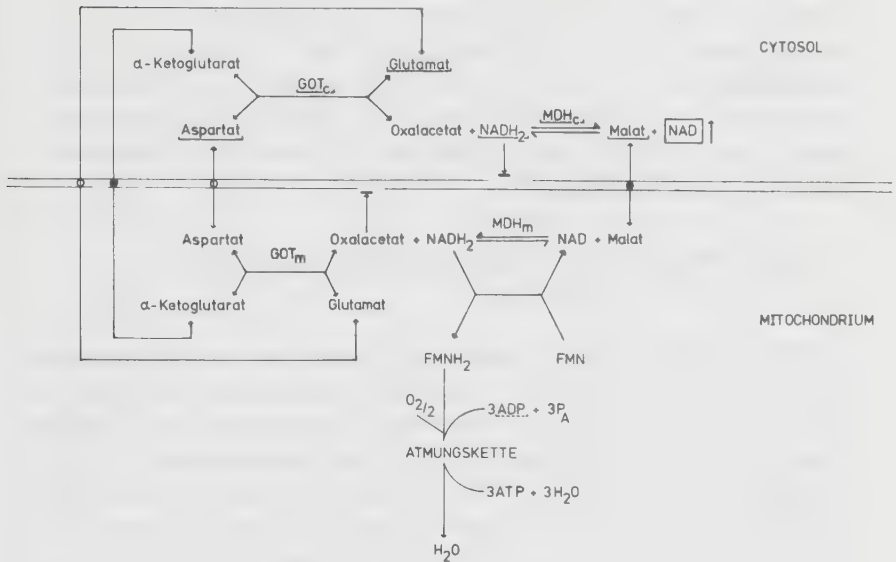


Abb. 5 : Schematische Darstellung des Wasserstoffshuttle über den Malat/Aspartat-Zyklus in Mitochondrien (modifiziert nach A.L. Lehninger (32))

● α -Ketoglutarat - Malat - Carrier

○ Aspartat - Glutamat - Carrier

— Reagentien, die obligat in den Inkubationsansatz eingebracht wurden

- - - Reagentien, die fakultativ in den Inkubationsansatz eingebracht wurden

□ Meßgröße

eingeschleust und dort wieder in Oxalacetat umgewandelt wird, kann exogen zugesetztes NADH zu NAD oxidiert werden. Gleichzeitig entsteht aus Oxalacetat wieder Malat, das von den Mitochondrien aufgenommen wird.

Die Gleichgewichtseinstellung dieser Reaktion wird durch Zusatz von Malat-Dehydrogenase katalysiert. Pro Molekül Malat, das von den Mitochondrien aufgenommen wird, entsteht im Reaktionszyklus stöchiometrisch extramitochondriales NAD. Dieses gebildete NAD wird als Meßgröße für den gesamten Transportvorgang herangezogen.

2.6.2.1. Messung der Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus

Zunächst erwies es sich als notwendig, die Kinetik des oben beschriebenen Vorgangs näher zu untersuchen. Zur Herstellung der Inkubationsansätze wurden die in Tabelle 1 S. 23 aufgeführten Substanzen in der angegebenen Konzentration und Reihenfolge in jeweils einen Erlmeyerkolben (≈ 25 ml) pipettiert. Die Inkubation erfolgte in einem Temperierbad von 37°C mit Schüttleinrichtung der Firma Braun Melsungen AG. (Schüttelfrequenz $80 \times \text{min}^{-1}$) Die Inkubationszeit wurde zwischen 10 min, 20 min und 30 min variiert. Der Start erfolgte jeweils durch Zugabe von 0,3 ml Mitochondriensuspension.

Die Schüttleinrichtung und die Benutzung von Erlmeyerkolben als Inkubationsgefäße sind zur Erzielung einer konstanten Sauerstoffsättigung der Inkubationsansätze notwendig. So kann verhindert werden, daß Sauerstoff zum begrenzenden Faktor der Transportaktivität wird.

Zusammensetzung des Inkubationspuffers:

(nach Berdanier und McNamara (14))

Mannitol	75 mM	
KH_2PO_4	10 mM	
KCl	75 mM	pH 7,4
MgSO_4	5 mM	
Tris	10 mM	

Tabelle 1 : Wasserstoffeinschleusung über den Malat/Aspartat-Zyklus in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

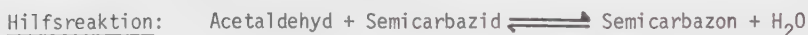
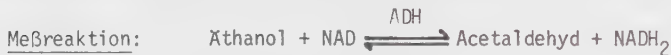
Ansatz-Nr.	1	2	3 (K)		5	6 (K)		8	9	10
Inkubationsdauer (min)	10	10	20	20	20	30	30	30	20	20
Inkub.-Puffer-Lsg. (ml)	2,3	2,2	2,5	2,3	2,2	2,5	2,3	2,2	2,3	2,2
NADH-Lsg. 90mM (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
ADP-Lsg. 120mM (ml)	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	-	0,1
Malat-Lsg. 30mM (ml)	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1
Aspartat-Lsg. 60mM (ml)	0,1	0,1	-	0,1	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1
Glutamat-Lsg. 500mM (ml)	0,04	0,04	-	0,04	0,04	-	0,04	0,04	0,04	0,04
MDH-Susp. 6000 U x ml ⁻¹ (ml)	0,01	0,01	-	0,01	0,01	-	0,01	0,01	0,01	0,01
Got-Susp. 2000 U x ml ⁻¹ (ml)	0,01	0,01	-	0,01	0,01	-	0,01	0,01	0,01	0,01
AOA-Lsg. 6mM (ml)	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02	0,02
Start: Mito.-Susp. (ml)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
ΔE_{340nm}	0,176	0,322	0,060	0,278	0,472	0,070	0,473	0,717	0,208	0,226
$\mu\text{mol NAD} \times \text{ml}^{-1}$ Probe	0,587	1,073	0,200	0,927	1,573	0,233	1,577	2,390	0,693	0,753
$\mu\text{mol NAD} \times \text{ml}^{-1}$ (Probe - Kontrolle)	0,370	0,856	-	0,710	1,356	-	1,360	2,173	0,476	0,536
$\mu\text{mol NAD} \times 3^{-1} \text{ml}^{-1}$ Inkub.-Ansatz	1,110	2,568	-	2,130	4,068	-	4,080	6,519	1,428	1,608
nmol NAD x mg ⁻¹ Mito.-Protein	179,0	414,2	-	343,5	656,1	-	658,1	1051,5	230,3	259,4
nmol NAD x min ⁻¹ x mg ⁻¹ Mito.-Protein	17,9	41,4	-	17,2	32,8	-	21,9	35,0	11,5	13,0

Substrat: Succinat:Rotenone RCR: 3,83 Substrat: Malat+Glutamat RCR: 11,56

Proteingehalt der Mito.-Susp.: 20,7 mg x ml⁻¹

Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Reaktion dadurch abgestoppt, daß die Inkubationsansätze sofort in auf 4 °C vorgekühlte Zentrifugenröhrchen ($\approx$ 12 ml) umgefüllt und ohne Verzögerung in der ebenfalls vorgekühlten Zentrifuge bei 12000 x g 5 min lang zentrifugiert wurden.

Der Mitochondrienniederschlag wurde verworfen und die NAD-Konzentration im Überstand nach der Methode von Klingenberg (25) bestimmt:



<u>Testansatz:</u>	Puffergemisch	2,000 ml
	Probe	0,100 ml
	Start: ADH	0,005 ml

Meßbedingungen: λ = 340 nm d = 1 cm

Berechnung:

$$c = \frac{E_{340}}{\epsilon \cdot d} \cdot \frac{v_t}{v_p} \cdot \frac{10^6}{10^3}$$

c : NAD-Konzentration in $\mu\text{mol} \times \text{ml}^{-1}$

E_{340} : Differenz der Extinktionen bei λ = 340 nm vor Zugabe und nach Zugabe von ADH

ϵ : Extinktionskoeffizient = $6,3 \cdot 10^3 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$

d : Schichtdicke (1 cm)

v_t : Testvolumen

v_p : Probenvolumen

Zusammensetzung des Puffergemisches:

Na ₄ P ₂ O ₇	10 H ₂ O	75 mM	
Semicarbazid	HCl	75 mM	pH 8,7 (mit 2 N NaOH
Glycin		23 mM	eingestellt)
(gelöst in 1 ml			
Äthanol absolut)			

Man erhält auf diese Weise die im Inkubationsansatz vorhandene NAD-Konzentration in $\mu\text{mol NAD} \times \text{ml}^{-1}$ Probe.

Die Umrechnung in $\text{nmol NAD} \times \text{mg}^{-1}$ Mitochondrienprotein ist in Tabelle 1 S. 23 angegeben.

2.6.2.2. Kinetik des Wasserstoffshuttle über den Malat/Aspartat-Zyklus

In den beschriebenen Vorversuchen mußte zunächst die Kinetik des Wasserstoffshuttle untersucht werden, um die geeignete Inkubationsdauer zu ermitteln. Hierzu wurden nach der beschriebenen Methode insgesamt zehn Ansätze 10 min, 20 min und 30 min lang inkubiert. Tabelle 1 S. 23 zeigt eine Aufstellung der Inkubationsansätze mit den ermittelten Meßdaten und den daraus berechneten Raten der Wasserstoffshuttle-Aktivität. Für jede Inkubationszeit wurden zwei Parallelansätze hergestellt, wobei jeweils nur ein Ansatz ADP enthielt.

Die Inkubation ohne bzw. mit ADP ermöglichte es, den Zusammenhang zwischen Wasserstoffshuttle und oxidativer Phosphorylierung meßbar zu machen.

Daneben wurden noch zwei Kontrollansätze mitgeführt, die jeweils nur ADP und NADH₂ enthielten, denen aber die für die Funktion des Shuttle notwendigen Substrate und Enzyme nicht zugesetzt wurden. Die in beiden Kontrollansätzen (K) ermittelten NAD-Konzentrationen wurden jeweils arithmetisch gemittelt und diese mittlere Konzentration als Leerwert von den NAD-Konzentrationen der Meßansätze subtrahiert. So wurde eine Verfälschung der Ergebnisse durch unspezifische, nicht im Rahmen des Shuttle-Mechanismus stattfindende NAD-Bildung ausgeschlossen.

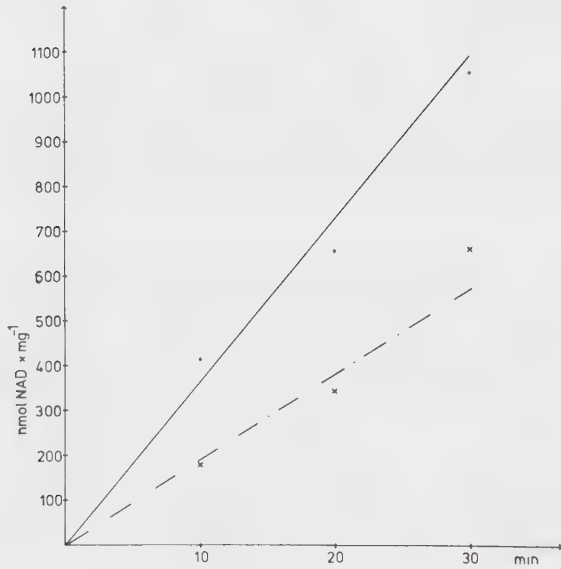


Abb. 6 : Wasserstoffeinschleusung über den Malat/Aspartat-Zyklus in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer; ohne Zusatz von ADP (× — —) und mit Zugabe von 4 mmol ADP x l⁻¹ (● —) zum Inkubationsansatz.

Außerdem wurden noch zwei Ansätze (9 und 10 in Tabelle 1 S.23) mit dem Transaminasenhemmstoff Aminooxiacetat (AOA) versetzt, um die Richtigkeit der theoretischen Überlegungen zum Mechanismus des Shuttle zu überprüfen.

Eine Hemmung der cytosolischen Transaminierungsreaktion, in der aus Aspartat Oxalacetat entsteht, muß zu einer Verminderung der Shuttle-Aktivität und damit der extramitochondrialen NAD-Bildung führen, was im Experiment auch der Fall war. (siehe Tabelle 1 S.23)

Aus diesen Vorversuchen ergab sich die in Abb. 6 S.26 dargestellte Kinetik der Wasserstoffeinschleusung über den Malat/Aspartat-Zyklus in das Mitochondrium. Sie zeigt, daß der Vorgang über 30 min linear verläuft, so daß man sich bei Wahl einer Inkubationszeit von 20 min im Proportionalitätsbereich des Reaktionsablaufes befindet. Daher wurde diese Inkubationszeit für alle folgenden Messungen verwendet. Bei jedem Versuch wurden ein Kontrollansatz, ein Ansatz ohne Zugabe von ADP und zwei Ansätze mit ADP mitgeführt.

2.6.2.3. Funktionsparameter der Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus

- a) Die NAD-Bildungsraten (Einheit: $\text{nmol NAD} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) lassen sich aus den NAD-Konzentrationen in den Meß- und Kontrollansätzen, der Inkubationsdauer und dem Proteingehalt der verwendeten Mitochondriensuspension bestimmen:

$$\text{NAD-Bildungsrate} = \frac{\text{NAD-Konzentration im Meßansatz} - \text{NAD-Konzentration im Kontrollansatz}}{\text{Inkubationsdauer} \cdot \text{eingesetzte Menge Mitochondrienprotein}}$$

Dieser Parameter stellt ein direktes Maß für die Aktivität des Wasserstoffshuttle über den Malat/Aspartat-Zyklus dar.

- b) Die "ADP-bedingte Wasserstoffshuttle-Aktivität" ergibt sich als Differenz der NAD-Bildungsraten mit und ohne ADP im Inkubationsansatz.

c) Als Parameter für die NAD-Permeabilität der Mitochondrienmembran kann die NAD-Bildung in den Kontrollansätzen (ohne Substrate und Enzyme) dienen. Da dieses NAD nicht auf dem Wege über den Malat/Aspartat-Zyklus entstanden sein kann, muß es sich hierbei um mitochondriales NAD handeln, das infolge einer Schädigung der Mitochondrienmembran in das umgebende Medium gelangen konnte. Die intakte Mitochondrienmembran ist für NAD/NADH impermeabel.

Der NAD-Ausstrom stellt somit ein direktes Maß für die NAD-Permeabilität und damit auch für die Schädigung der Mitochondrienmembran dar.

Die NAD-Bildung in den Kontrollansätzen kann nicht durch die Freisetzung mitochondrialer Enzyme, welche das zugesetzte NADH_2 oxidieren, erklärt werden, da bei der langen Inkubationszeit und der zu erwartenden hohen Aktivität dieser Enzyme das gesamte eingesetzte NADH_2 umgesetzt hätte werden müssen, was im Experiment nicht der Fall war. (siehe Tabelle 1 S. 23)

2.7. Statistische Methoden

Für jeden mitochondrialen Funktionsparameter wurden aus jeweils sechs Versuchen der drei Versuchsserien (1), 2) und 3) in 2.6.4.1. S.18) folgende statistische Größen berechnet:

arithmetisches Mittel:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + \dots + x_n}{n}$$

Standardabweichung:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

mittlerer Fehler:

(S tandard Error of the Mean)

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Variationskoeffizient:

$$V_{\%} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Für die Funktionsparameter " RCR (Malat + Glutamat) ", " RCR (Succinat + Rotenone) ", "ADP-bedingte Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus ", " NAD-Ausstrom " und " Q " wurde darüber hinaus eine einfache Varianzanalyse durchgeführt. (26 ; 27)

Wie in der Literatur üblich wurden dabei die erforderlichen Voraussetzungen a) die Versuchsergebnisse der einzelnen Versuchsserien folgen einer Normalverteilung

b) die Versuchsserien haben die gleiche Varianz als gegeben betrachtet.

Zunächst wurde jeweils überprüft, ob sich die drei Versuchsserien hinsichtlich des entsprechenden Parameters auf dem gewählten Signifikanzniveau unterscheiden.

War dies der Fall, so wurden jeweils die einzelnen Versuchsreihen gegeneinander, unter Zugrundelegung des entsprechenden Signifikanzniveaus, auf Unterschiede hin untersucht.

Da die verschiedenen Funktionsparameter, die jeweils aus einem Versuch entnommen wurden, über das Ausgangsmaterial, i.e. das gleiche Organ bzw. das gleiche Versuchstier, zusammenhängen (Problematik der multiplen Tests: mehrfache Tests über die gleiche Stichprobe), wurde als Ausgleich bei allen Berechnungen das Signifikanzniveau $\alpha \leq 0,1 \%$ ($p \leq 0,001$) zugrundegelegt, die entsprechenden Aussagen zu den Ergebnissen jedoch auf das Signifikanzniveau $\alpha \leq 1 \%$ ($p \leq 0,01$) zurückgenommen.

3. E R G E B N I S S E

3.1. Einfluß der Ischämie auf Sauerstoffverbrauchsrate und Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus in Rattenlebermitochondrien

Die ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 2 S.32 zusammenfassend dargestellt.

3.1.1. Sauerstoffverbrauchsrate in Abhängigkeit von der Ischämie bei 37 °C und 4 °C

Wie aus Abb. 7 S.33 zu ersehen ist, nimmt die Sauerstoffverbrauchsrate in "state 3" bei Verwendung von Succinat als Substrat nach einer Ischämiedauer von 40 min bei 37 °C um 52 % ab, während sie nach gleicher Ischämiezeit bei 4 °C praktisch unverändert gegenüber der Kontrolle (0 min Ischämie) bleibt.

Die Sauerstoffverbrauchsrate in "state 4" mit Succinat als Substrat sind sowohl ohne als auch mit Ischämie praktisch gleich.

Mit Malat und Glutamat als Substrat (siehe Abb. 8 S.34) nimmt die Sauerstoffverbrauchsrate in "state 3" nach einer Ischämiezeit von 40 min bei 37 °C um 63 % ab, wogegen sie nach gleicher Ischämiedauer bei 4 °C praktisch wiederum unverändert gegenüber der Kontrolle bleibt.

Die Sauerstoffverbrauchsrate in "state 4" bleiben auch bei Verwendung von Malat und Glutamat als Substrat in allen drei Versuchsserien nahezu unverändert.

Die aus der Differenz zwischen den Sauerstoffverbrauchsrate in "state 3" und "state 4" berechnete "ADP-bedingte Sauerstoffverbrauchsrate" (siehe Tabelle 2 S.33) nimmt nach einer Ischämiezeit von 40 min sogar um 74 % ab, dagegen bleibt sie nach gleicher Ischämiedauer bei 4 °C praktisch unverändert gegenüber der Kontrolle.

Die Auswirkungen der Ischämie auf den für die Beurteilung der Mitochondrienfunktion wichtigen Atmungskontrollquotienten (RCR) sind aus Tabelle 2 S.33 zu entnehmen.

Tabelle 2 : Einfluß der Ischämie auf Sauerstoffverbrauchsrate und Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus in Rattenlebermitochondrien

Ischämie- dauer (min)	Ischämie- temperatur (°C)	Sauerstoffverbrauchsrate			Sauerstoffverbrauchsrate			Wasserstoffshuttle-Aktivität		
		Substrat: Succinat/Rotomone			Substrat: Malat/Aspartat					
		"state 4"	"state 3"	RGR	"state 4"	"state 3"	"ADP-bed."	RGR	-ADP	"ADP-bed."
0		1,2 ± 0,1	23,2 ± 1,2	3,22 ± 0,08	3,1 ± 0,2	20,7 ± 0,6	17,6 ± 0,1	6,78 ± 0,08	14,9 ± 1,1	18,9 ± 0,8
40	37	6,5 ± 0,4	11,1 ± 0,9	1,70 ± 0,04	3,0 ± 0,1	7,6 ± 0,9	4,6 ± 0,6	2,54 ± 0,15	16,6 ± 0,6	5,0 ± 1,1*
40	4	8,9 ± 0,4	24,9 ± 1,3	2,81 ± 0,16	1,7 ± 0,3	18,9 ± 1,8	15,2 ± 1,6	5,11 ± 0,32	14,9 ± 1,2	16,9 ± 1,1

Alle Angaben verstehen sich als arithmetisches Mittel ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) aus 6 Versuchen.

Die Mittelwerte der Sauerstoffverbrauchsrate sind in $\text{nmol O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und nmol^{-1} Mitochondrienprotein angegeben.

Die Mittelwerte der Wasserstoffshuttle-Aktivität sind in $\text{nmol ADP} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und nmol^{-1} Mitochondrienprotein ausgedrückt; bei

Anwesenheit von ADP betrug dessen Konzentration $4 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ im Inkubationsansatz.

Die Bedingungen für "state 4" und "state 3", sowie die Berechnung der "ADP bed.", "Sauerstoffverbrauchen", der "respiratory control ratio" (RCR) und der "ADP bed.", "Wasserstoffshuttle-Aktivität" sind unter Methoden beschrieben.

* : Statistisch signifikante Abweichung gegenüber dem Kontrollwert (0 min Ischämie) $p \leq 0,01$

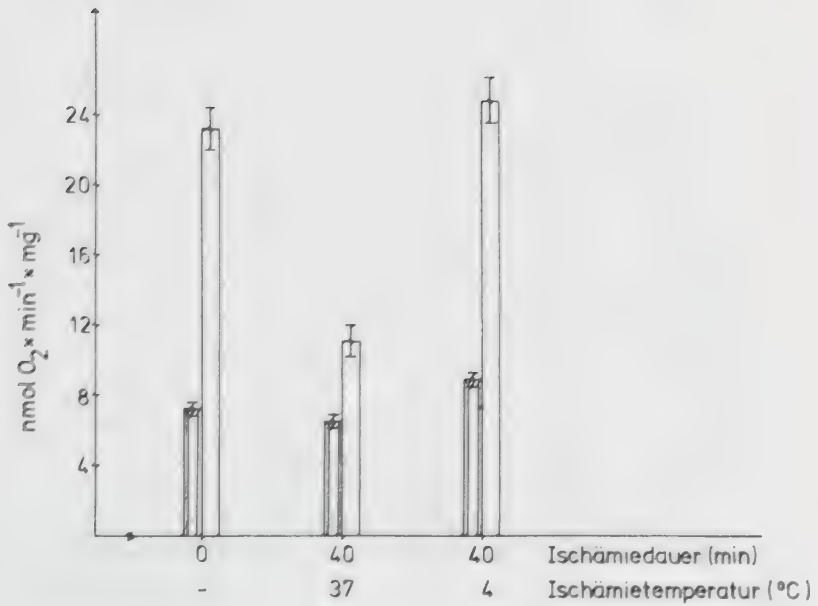


Abb. 7 : Sauerstoffverbrauchsraten in Abhängigkeit von Ischämiedauer und Ischämietemperatur in "state 4"  und in "state 3"  unter Verwendung von Succinat + Rotenone als Substrat.

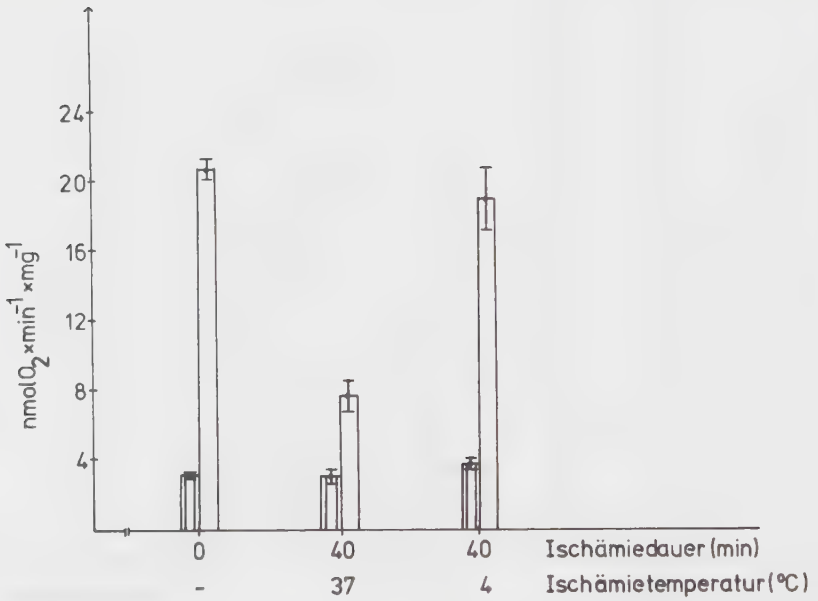


Abb. 8 : Sauerstoffverbrauchsrate in Abhängigkeit von Ischämiedauer und Ischämietemperatur in "state 4"  und in "state 3"  unter Verwendung von Malat + Glutamat als Substrat.

Bei beiden Substraten kommt es nach 40minütiger Ischämie bei 37 °C zu einer signifikanten ($p \leq 0.01$) Abnahme von 3,22 auf 1,70 bzw. von 6,78 auf 2,54.

Nach gleicher Ischämiezeit bei 4 °C ist dagegen kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle feststellbar.

3.1.2. Die Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus

Abb. 9 S.36 zeigt, daß die Wasserstoffshuttle-Aktivität ohne ADP im Inkubationsansatz nach einer Ischämiedauer von 40 min bei 37 °C geringfügig ansteigt, wogegen sie nach gleicher Ischämiezeit bei 4 °C unverändert gegenüber der Kontrolle (0 min Ischämie) bleibt.

Die Wasserstoffshuttle-Aktivität mit ADP im Inkubationsansatz geht dagegen nach einer Ischämiezeit von 40 min bei 37 °C um 36 % zurück, während sie nach gleicher Ischämiedauer bei 4 °C nahezu keinen Unterschied zur Kontrolle zeigt.

Die gemessenen NAD-Bildungsraten zeigen zum Teil höhere Werte als im Hinblick auf die entsprechenden Sauerstoffverbrauchsraten zu erwarten ist. (Theoretisch ist für die Oxidation von einem Molekül NADH zu NAD mindestens ein halbes Molekül Sauerstoff nötig.) Dieser Sachverhalt ist dadurch zu erklären, daß aus technischen Gründen die Messung der Aktivität des Wasserstoffshuttle bei einer höheren Temperatur (37 °C) erfolgte als dies bei der Sauerstoffverbrauchsmessung (25 °C) der Fall war. Wie aus Tabelle 2 S.32 hervorgeht, nimmt die sich aus der Differenz der beiden oben genannten Parameter ergebende "ADP-bedingte Wasserstoffshuttle-Aktivität" nach einer Ischämiezeit von 40 min bei 37 °C gegenüber der Kontrolle (0 min Ischämie) signifikant ($p \leq 0.01$) von 18,9 auf 5,0 nmol NAD x min⁻¹ x mg⁻¹ ab, wohingegen nach gleicher Ischämiedauer bei 4 °C auf diesem Signifikanzniveau statistisch kein Unterschied zur Kontrolle nachweisbar ist.

Abb.10 S.37 zeigt, daß die Auswirkungen der Ischämie auf die "ADP-bedingten Sauerstoffverbrauchsraten" mit Malat und Glutamat als Substrat und die "ADP-bedingten Wasserstoffshuttle-Aktivitäten" über den Malat/Aspartat-Zyklus gut miteinander korrelieren.

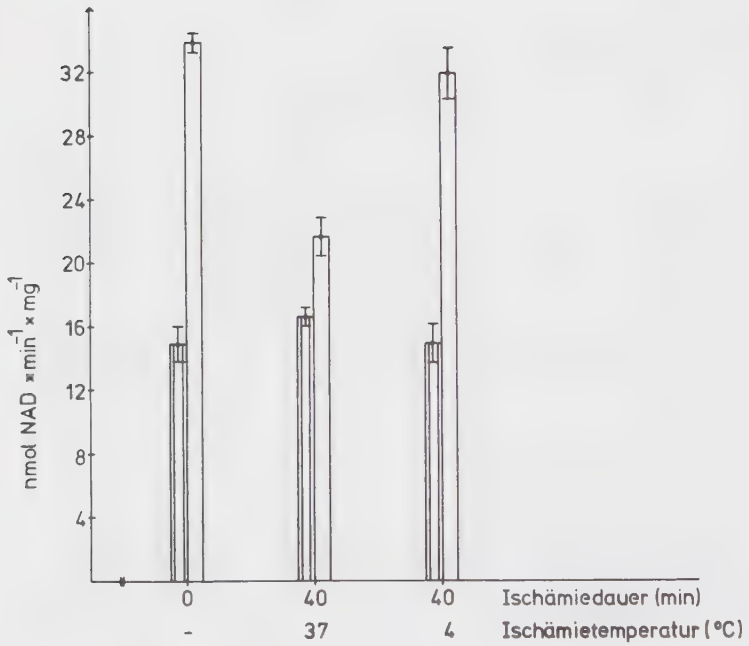


Abb. 9 : Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus in Abhängigkeit von Ischämiedauer und Ischämietemperatur; ohne Zugabe von ADP $\blacksquare$ und in Anwesenheit von 4 mmol ADP $\times$ l $^{-1}$ $\square$ im Inkubationsansatz.

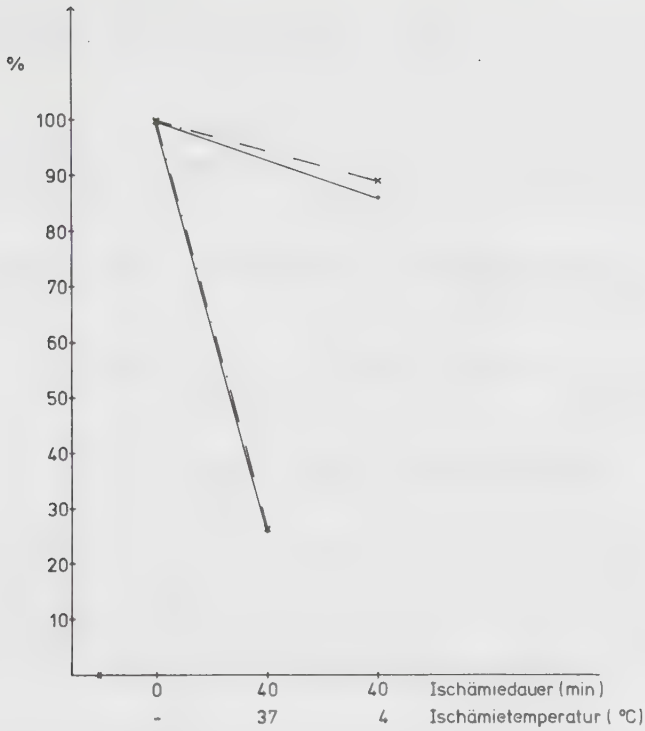


Abb. 10 : Korrelation der "ADP-bedingten Sauerstoffverbrauchsrate" mit Malat + Glutamat als Substrat (● —) und der "ADP-bedingten Wasserstoffshuttle-Aktivität" über den Malat/Aspartat-Zyklus (x - -) in Rattenlebermitochondrien bei variablen Ischämiebedingungen.

Nach einer Ischämiedauer von 40 min bei 37 °C kommt es zu einem Rückgang sowohl der "ADP-bedingten Sauerstoffverbrauchsrate" mit Malat und Glutamat als auch der "ADP-bedingten Wasserstoffshuttle-Aktivität" auf jeweils 26 % des Kontrollwertes.

Nach gleicher Ischämiezeit bei 4 °C vermindern sich die "ADP-bedingten Sauerstoffverbrauchsrate" mit Malat und Glutamat auf 86 %, die "ADP-bedingte Wasserstoffshuttle-Aktivität" auf 89 % des Kontrollwertes.

3.2. Einfluß der Ischämie auf die Permeabilität der Mitochondrienmembran

Die erzielten Ergebnisse sind in Tabelle 3 S.39 zusammenfassend dargestellt.

3.2.1. NAD-Permeabilität der Mitochondrienmembran

Wie auf Abb.11 S.40 graphisch dargestellt ist, nimmt der NAD-Ausstrom nach einer Ischämiedauer von 40 min bei 37 °C gegenüber der Kontrolle (0 min Ischämie) signifikant ($p \leq 0,01$) zu, wogegen nach gleicher Ischämiezeit bei 4 °C auf diesem Signifikanzniveau statistisch kein Unterschied im Vergleich mit dem Kontrollwert feststellbar ist.

3.2.2. Oxalacetat-Permeabilität der Mitochondrienmembran ("Q")

Für "Q" kann nach einer Ischämiezeit von 40 min bei 37 °C auf dem Signifikanzniveau $p \leq 0,01$ kein Unterschied zum Kontrollwert (0 min Ischämie) festgestellt werden. (siehe Tabelle 3 S.39)

Dagegen ist nach gleicher Ischämiedauer bei 4 °C ein signifikanter ($p \leq 0,01$) Anstieg gegenüber der Kontrolle erkennbar. Es kann jedoch, im Gegensatz zu allen vorherigen Ergebnissen, zwischen dem Wert nach 40minütiger Ischämie bei 37 °C und dem Wert nach gleicher Ischämiedauer bei 4 °C kein statistisch signifikanter ($p \leq 0,01$) Unterschied beobachtet werden.

Tabelle 3 : Einfluß der Ischämie auf die Permeabilität der Mitochondrienmembran

Ischämiedauer (min)	Ischämietemperatur (°C)	"NAD-Ausstrom"	"Q"
0	-	3,7 ± 0,4	0,33 ± 0,03
40	37	14,2 ± 1,8 x	0,45 ± 0,02
40	4	2,9 ± 0,5	0,54 ± 0,04 x

Definition und Berechnung des "NAD-Ausstrom", der als Parameter für die NAD-Permeabilität der Mitochondrienmembran gilt, sowie von "Q", der als Parameter für die Oxalacetat-Permeabilität der Mitochondrienmembran gilt, sind unter Methoden beschrieben.

Der "NAD-Ausstrom" ist in $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Mitochondrienprotein angegeben.

Alle Angaben verstehen sich als arithmetische Mittelwerte ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) aus 6 Versuchen.

x : Statistisch signifikante Abweichung gegenüber dem Kontrollwert (0 min Ischämie) - $p \leq 0,01$

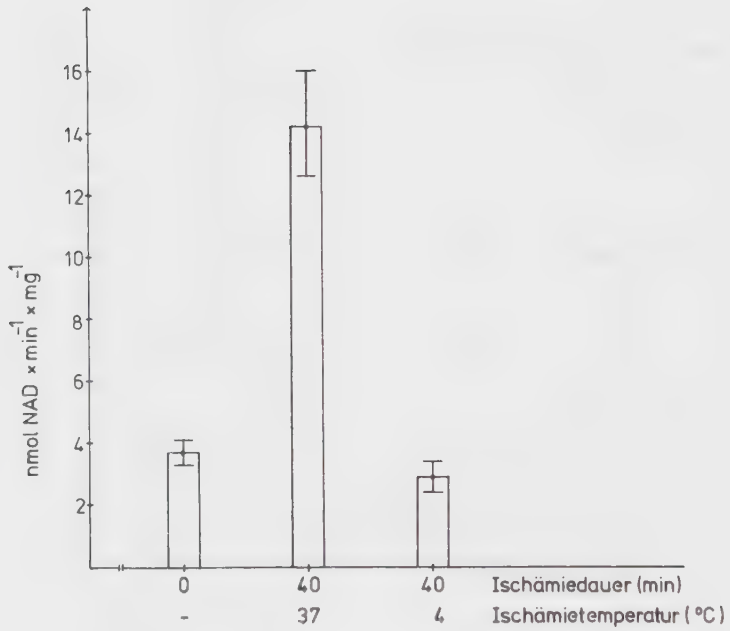


Abb. 11 : "NAD-Ausstrom" aus Rattenlebermitochondrien in Abhängigkeit von Ischämiedauer und Ischämietemperatur.

3.3. Untersuchungen zum Mechanismus der ischämischen Schädigung der Rattenlebermitochondrien

3.3.1. Einfluß von Chlorpromazin auf die ischämischen Funktionsstörungen in Rattenlebermitochondrien

Tabelle 4 S.42 zeigt, daß bei den gewählten Dosen des Pharmakons und unter den beschriebenen Versuchsbedingungen Chlorpromazin die ischämiebedingten Funktionseinschränkungen nicht verhindern kann.

Sowohl die Sauerstoffverbrauchsdaten mit Succinat und Malat/Glutamat als Substrat, als auch die Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus lassen keine Unterschiede zwischen vorbehandelten und unbehandelten Versuchstieren erkennen.

Die RCR-Werte bleiben bei allen verwendeten Chlorpromazindosen erniedrigt und etwa im selben Bereich von 1,42 - 1,57 bzw. 2,05 - 3,54, wie die ohne Vorbehandlung ermittelten Werte. (1,70 bzw. 2,54)

Die "ADP-bedingte Wasserstoffshuttle-Aktivität" ist nach Chlorpromazinvorbehandlung in manchen Fällen sogar noch stärker beeinträchtigt als bei unbehandelten Tieren.

Tabelle 5 S.43 zeigt jedoch, daß die Vorbehandlung mit Chlorpromazin die Mitochondrienmembran weniger durchlässig für NAD macht. In Abhängigkeit von der Dosis kommt es zu einer Abnahme der NAD-Permeabilität um 44 % - 78 % gegenüber dem Wert für unbehandelte Tiere.

Aus der gleichen Tabelle ist zu entnehmen, daß durch die Vorbehandlung mit Chlorpromazin in bezug auf die Oxalacetat-Permeabilität ("O") der Mitochondrienmembran praktisch kein Unterschied gegenüber dem Ergebnis bei unbehandelten Versuchstieren zu erzielen ist.

Tabelle 5 : Einfluß von Chlorpromazin auf die Permeabilität der Mitochondrienmembran nach einer Ischämiedauer von 40 min bei einer Ischämietemperatur von 37 °C

Chlorpromazindosis	"NAD-Ausstrom"	"Q"
-	14,2	0,45
25	4,7	0,48
50	3,1	0,45
75	8,0	0,58
100	4,1	0,58

Das Chlorpromazin wurde den Versuchstieren intraperitoneal appliziert; die Inkubationszeit variierte zwischen 30 min und 120 min.

Die Chlorpromazindosis ist in $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ Körpergewicht der Versuchstiere angegeben.

Definition und Berechnung des "NAD-Ausstrom", der als Parameter für die NAD-Permeabilität der Mitochondrienmembran gilt, sowie von "Q", der als Parameter für die Oxalacetat-Permeabilität der Mitochondrienmembran gilt, sind unter Methoden beschrieben.

Der "NAD-Ausstrom" ist in $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Mitochondrienprotein ausgedrückt.

3.3.2. Einfluß von Calcium auf die Funktion und Membranpermeabilität von Rattenlebermitochondrien aus Kontrolltieren (0 min Ischämie)

Tabelle 6 S.45 zeigt, daß ansteigende Konzentrationen von Ca^{2+} -Ionen im Inkubationsansatz mit beiden Substraten zu einem zunehmenden Verlust der Atmungskontrolle führen.

Bei Verwendung von Malat und Glutamat als Substrat kommt es bereits bei einer Calcium-Konzentration von $40 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1}$ zum vollständigen Verlust der Atmungskontrolle und dementsprechend ist sowohl der Sauerstoffverbrauch als auch die Wasserstoffshuttle-Aktivität nicht mehr mit ADP stimulierbar.

Bei Verwendung von Succinat als Substrat tritt der vollständige Verlust der Atmungskontrolle erst bei einer Ca^{2+} -Konzentration von $75 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1}$ auf.

Zunehmende Ca^{2+} -Konzentrationen zeigen bei den verschiedenen Substraten eine unterschiedliche Wirkung auf die Sauerstoffverbrauchsraten.

Bei hoher Calcium-Konzentration ($75 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1}$) kommt es mit Succinat als Substrat zu einer Stimulierung des Sauerstoffverbrauches in "state 4" auf $25,1 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$, die durch die Zugabe des Entkopplers 2,4 - DNP ($67 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1}$) nicht mehr gesteigert werden kann.

Dagegen kommt es mit Malat und Glutamat als Substrat bei dieser Ca^{2+} -Konzentration zu keinem Anstieg in "state 4", jedoch zu einem starken Abfall der "state 3"-Atmung von 20,7 auf $3,9 \text{ nmol } \text{O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. Der Sauerstoffverbrauch läßt sich auch hier durch 2,4 - DNP nicht zusätzlich anregen.

Wie zu erwarten war, ist die "ADP-bedingte Wasserstoffshuttle-Aktivität" ab einer Ca^{2+} -Konzentration von $40 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1}$ nicht mehr nachweisbar. Die NAD-Bildungsraten werden jedoch auch ohne ADP im Inkubationsansatz auf $36,0 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ erhöht. Dieses Ergebnis kann im Hinblick auf den starken Rückgang der Sauerstoffverbrauchsraten in "state 3" nicht allein auf die unterschiedlichen Temperaturverhältnisse bei der Messung der beiden Funktionsparameter zurückgeführt werden. (Erklärung siehe 4. Diskussion)

Tabelle 6 : Einfluß von Calcium und Oleat auf die Funktion und Membranpermeabilität von Rattenlebermitochondrien aus Kontrolltieren (0 min Ischämie)

Zusätze zur Mitochondrien-suspension	Sauerstoffverbrauchsrate Substrat: Succinat+Rotenone "state 4" "state 3" RCR		Sauerstoffverbrauchsrate Substrat: Malat+Glutamat "state 4" "state 3" "ADP-bed." RCR		"Q"	Wasserstoffshuttle-Aktivität -ADP +ADP		"ADP-bed." "NAD-Ausstrom"			
	7,2	23,2	3,1	20,7		17,6	6,78		0,33	14,9	33,8
-											
CaCl ₂ 20	6,7	23,5	3,2	16,6	13,4	5,19	0,44	26,9	36,2	9,3	3,2
CaCl ₂ 40	7,6	13,4	9,1	9,1	0,0	1,00	0,76	26,2	21,4	0,0	2,7
CaCl ₂ 75	25,1	25,1	3,9	3,9	0,0	1,00	0,86	36,0	35,2	0,0	4,0
(" +2,4-DNP 67)	25,1	25,1	3,9	3,9	0,0	1,00	-	-	-	-	-
Na-Oleat 25	14,1	14,1	7,4	7,4	0,0	1,00	0,58	16,4	17,3	0,9	4,1
Na-Oleat 45	19,1	19,1	12,2	12,2	0,0	1,00	0,15	9,4	13,2	3,8	8,5
Na-Oleat 180	8,3	8,3	3,2	3,2	0,0	1,00	1,00	0,0	0,0	0,0	8,4

Die Inkubationszeit der Zusätze betrug jeweils 10 min bei 4 °C. Die Inkubationsansätze mit Na-Oleat enthielten noch jeweils 0,6 mmol x l⁻¹ Carnitin und 0,2 mmol x l⁻¹ CaCl₂. Die Zusätze zur Mitochondrien-suspension sind in mmol x mg⁻¹ Mitochondrienprotein angegeben. Die Sauerstoffverbrauchsrate sind in mmol O₂ x min⁻¹ x mg⁻¹ Mitochondrienprotein ausgedrückt. Die Wasserstoffshuttle-Aktivität ist in mmol NAD x min⁻¹ x mg⁻¹ Mitochondrienprotein angegeben; bei Anwesenheit von ADP betrug dessen Konzentration 4,0 mmol x l⁻¹ im Inkubationsansatz. Der "NAD-Ausstrom" ist in mmol NAD x min⁻¹ x mg⁻¹ Mitochondrienprotein ausgedrückt. Die Bedingungen für "state 4" und "state 3", sowie die Definition bzw. Berechnung der "Respiratory-Control-Ratio" (RCR), der "ADP-bed. Sauerstoffverbrauchsrate", der "ADP-bed. Wasserstoffshuttle-Aktivität", des "NAD-Ausstrom" und von "Q" sind unter Methoden beschrieben.

Tabelle 6 S. 45 zeigt, daß es dosisabhängig zu einer Zunahme der Oxalacetat-Permeabilität der Mitochondrienmembran von 0,33 auf 0,86 kommt. Dagegen wird die NAD-Permeabilität der Membran durch CaCl_2 praktisch nicht beeinflusst. ($3,7$ bzw. $4,0 \text{ nmol NAD} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ in Ab- und Anwesenheit von $75 \text{ nmol CaCl}_2 \times \text{mg}^{-1}$)

3.3.3. Einfluß von Na-Oleat auf die Funktion und Membranpermeabilität von Rattenlebermitochondrien aus Kontrolltieren (0 min Ischämie)

Tabelle 6 S. 45 zeigt bei beiden Substraten im Konzentrationsbereich von 0 - $45 \text{ nmol Na-Oleat} \times \text{mg}^{-1}$ eine dosisabhängige Zunahme der Sauerstoffverbrauchsrate in "state 4" von $7,2$ auf $19,1$ bzw. von $3,1$ auf $12,2 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$. Dagegen bleiben sie bei der sehr hohen Dosis von $180 \text{ nmol Na-Oleat} \times \text{mg}^{-1}$ im Bereich der Vergleichswerte für Mitochondrien ohne Zusatz von Na-Oleat. ($8,3$ bzw. $3,2 \text{ nmol O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ im Vergleich zu $7,2$ bzw. $3,1 \text{ nmol O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)

Die Sauerstoffverbrauchsrate in "state 3" zeigen mit beiden Substraten den Trend zur dosisabhängigen Abnahme von $23,2$ auf $8,3$ bzw. von $20,7$ auf $3,2 \text{ nmol O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.

Mit beiden Substraten kommt es bereits bei der niedrigsten Konzentration von $25 \text{ nmol Na-Oleat} \times \text{mg}^{-1}$ zum vollständigen Verlust der Atmungskontrolle ($\text{RCR} = 1,00$) und entsprechend zum Erliegen des "ADP-bedingten Sauerstoffverbrauches" bei Verwendung von Malat und Glutamat als Substrat.

Abb. 12 S. 47 zeigt, daß die Wasserstoffshuttle-Aktivität ohne ADP im Inkubationsansatz bei der niedrigsten Dosierung von $25 \text{ nmol Na-Oleat} \times \text{mg}^{-1}$ zunächst gegenüber dem Vergleichswert leicht ansteigt, um dann dosisabhängig abzunehmen und bei einer Konzentration von $180 \text{ nmol Na-Oleat} \times \text{mg}^{-1}$ vollständig zu sistieren.

Die Wasserstoffshuttle-Aktivität mit ADP im Inkubationsansatz fällt dosisabhängig ab, um ebenfalls bei einem Gehalt von $180 \text{ nmol Na-Oleat} \times \text{mg}^{-1}$ im Inkubationsansatz zum Erliegen zu kommen.

Aus Tabelle 6 S. 45 geht hervor, daß eine Stimulierung der Wasserstoffshuttle-Aktivität durch ADP-Zusatz bei allen Na-Oleat Konzentrationen praktisch nicht mehr möglich ist.

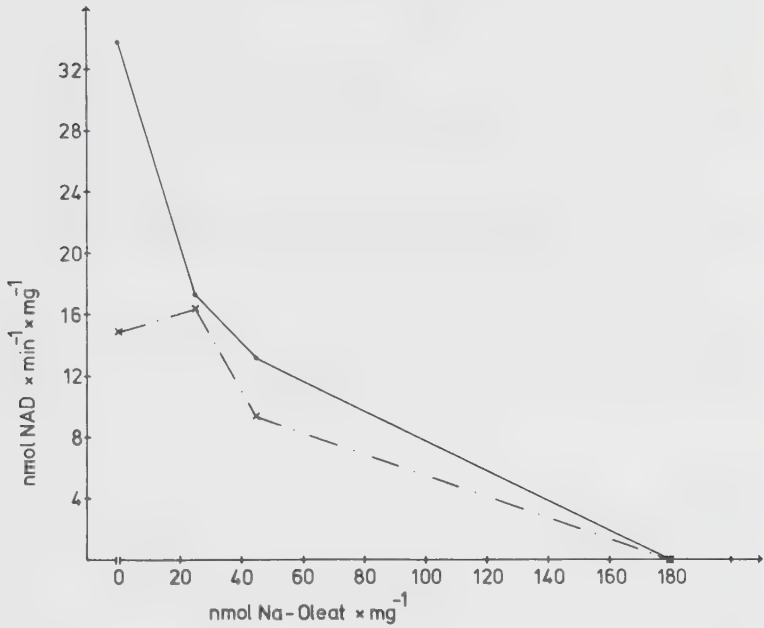


Abb. 12 : Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus in Abhängigkeit von der Na-Oleat Zugabe zum Inkubationsansatz bei einer Ischämiedauer von 0 min;
 ohne Zusatz von ADP (x — . —) und mit Zugabe von 4 mmol ADP $\times 1^{-1}$ (• —) zum Inkubationsansatz.

Ebenfalls aus Tabelle 6 S.45 ist zu entnehmen, daß die Oxalacetat-Permeabilität der Mitochondrienmembran den Trend zur dosisabhängigen Zunahme gegenüber dem Vergleichswert (ohne Zusatz von Na-Oleat) zeigt und bei der höchsten Konzentration von $180 \text{ nmol Na-Oleat} \times \text{mg}^{-1}$ den Maximalwert 1,00 erreicht.

Die NAD-Permeabilität der Mitochondrienmembran bleibt bei einem Gehalt von $25 \text{ nmol Na-Oleat} \times \text{mg}^{-1}$ im Inkubationsansatz mit einem Wert von $4,1 \text{ nmol NAD} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ zunächst im Bereich des Vergleichswertes ($3,7 \text{ nmol NAD} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$), steigt bei einer Konzentration von $45 \text{ nmol Na-Oleat} \times \text{mg}^{-1}$ auf $8,5 \text{ nmol NAD} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ an und verändert sich demgegenüber auch bei einem Gehalt von $180 \text{ nmol Na-Oleat}$ im Inkubationsansatz praktisch nicht mehr.

4. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen einer 40minütigen Ischämie bei 37 °C und 4 °C auf verschiedene Funktionen der Rattenleber-mitochondrien zu untersuchen. Daneben sollte die Möglichkeit einer protektiven Wirkung durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit Chlorpromazin unter diesen Versuchsbedingungen überprüft werden und weitere Untersuchungen zum Mechanismus der ischämischen Zellschädigung vorgenommen werden.

4.1. Einfluß der Ischämie auf die Sauerstoffverbrauchsrate und die Aktivität des Wasserstoffshuttle über den Malat/Aspartat-Zyklus

Die erzielten Ergebnisse zeigen eindeutig, daß das Mitochondrium nach einer Ischämiedauer von 40 min bei 37 °C funktionell erheblich geschädigt ist. Durch Absenkung der Gewebstemperatur auf 4 °C während der 40minütigen Ischämie konnten die ischämischen Schädigungen praktisch verhindert werden.

Nach einer Ischämiedauer von 40 min bei 37 °C kommt es zu einem weitgehenden Verlust der Atmungskontrolle. Der Atmungskontrollquotient (RCR) sinkt bei Verwendung von Succinat als Substrat auf etwa 53 % des Kontrollwertes (0 min Ischämie) ab; wurde Malat als Substrat verwendet, so kam es sogar zu einem Absinken auf 38 % des Ausgangswertes. In beiden Fällen handelt es sich um einen statistisch signifikanten ($p \leq 0,01$) Rückgang. Der signifikante Abfall des Atmungskontrollquotienten ist bei beiden Substraten auf ein starkes Absinken der Sauerstoffverbrauchsrate in "state 3" zurückzuführen, während die Sauerstoffverbrauchsrate in "state 4" kaum beeinflußt werden. (siehe Abb. 7 S. 33 u. Abb. 8 S. 34) Erfolgte während der Ischämiedauer eine Absenkung der Gewebstemperatur auf 4 °C , so kommt es mit beiden Substraten nur zu einem geringen Abfall des Atmungskontrollquotienten (auf 87 % mit Succinat und auf 75 % mit Malat als Substrat), der jeweils auf dem $p \leq 0,01$ Niveau statistisch nicht signifikant ist. (siehe Tabelle 2 S. 32)

Die bei warmer Ischämie (37°C) beobachtete Abnahme der Atmungskontrolle geht im wesentlichen auf Veränderungen der "state 3"-Atmung zurück, da sich die Sauerstoffverbrauchsrate in "state 4" in allen Versuchsreihen nur sehr geringfügig ändern.

Es kommt somit nicht zu einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung.

Die innere Mitochondrienmembran bleibt soweit intakt, daß trotz Ischämie die Ausbildung eines Protonengradienten möglich ist. Die ischämiebedingten Schädigungen der Mitochondrienfunktion müssen daher auf einer Schädigung des Elektronentransportsystems der Atmungskette oder des ATP-synthetisierenden Systems bei unverändert gekoppelten Mitochondrien beruhen.

Eine Abnahme der "state 3"-Atmung ohne Zunahme der Sauerstoffverbrauchsrate in "state 4" als Ursache für das Absinken des Atmungskontrollquotienten wird auch von Boime, Smith und Hunter (5 ; 8) , Herdson et al. (28) und von Daniel und Beaudoin (11) beschrieben.

Es fällt auf, daß die ischämischen Funktionsschäden bei Verwendung von Succinat als Substrat deutlich geringer ausfallen als bei der Verwendung von Malat. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von anderen Autoren gemacht.

So berichten Baue und Sayeed (9) von der wesentlich geringeren Empfindlichkeit der mitochondrialen Funktionen gegenüber Ischämie, falls Succinat anstatt von α - Ketoglutarat als Substrat verwendet wurde.

Rhodes, DePalma und Druet (7) machten die gleichen Beobachtungen und stellten die Vermutung an, daß das NAD/NADH - System, über das der Substratwasserstoff bei Verwendung von α - Ketoglutarat bzw. von Malat eingeschleust wird, im Hinblick auf die ischämischen Funktionsstörungen einen vulnerablen Teil der Atmungskette darstellt als das FMN/FMNH - System, über das der Substratwasserstoff bei Verwendung von Succinat als Substrat einfließt.

Ganz ähnlich wie die Sauerstoffverbrauchsrate verhält sich die bei Ischämie erstmals untersuchte Aktivität des Wasserstoffshuttle über den Malat/Aspartat-Zyklus.

Dieser Funktionsparameter wurde erstmals von den Autoren Berdanier und McNamara (14) bei gerontologischen Studien an Rattenlebermitochondrien untersucht.

Während die Shuttle-Aktivität ohne ADP im Inkubationsansatz in allen drei Versuchsserien sehr geringe Unterschiede zeigt, fällt sie bei Zusatz von ADP nach einer Ischämiezeit von 40 min bei 37 °C auf etwa 64 % des Kontrollwertes (0 min Ischämie) ab, wohingegen bei einer Ischämietemperatur von 4 °C unter sonst gleichen Bedingungen nur ein Abfall auf ca. 94 % des Ausgangswertes beobachtet wird. (siehe Abb. 9 S. 36)

Besonders auffällig ist die gute Korrelation der "ADP-bedingten Sauerstoffverbrauchsrate" mit der "ADP-bedingten Wasserstoffshuttle-Aktivität" bei Verwendung von Malat als Substrat. (siehe Abb. 10 S. 37)

Dabei ist die Abnahme der Shuttle-Aktivität nie größer als die Abnahme der mitochondrialen Atmung. Dies legt den Schluß nahe, daß der Rückgang der Atmungskapazität durch Schädigung des Elektronentransportes in der Atmungskette primär die Ursache für die Verminderung der Wasserstoffshuttle-Aktivität darstellt.

Eine ischämiebedingte Schädigung der Membran und damit der Carriersysteme des Shuttle ist zwar nicht auszuschließen, doch ist sie offensichtlich von geringerer funktioneller Bedeutung als die Schädigung der Atmungskette.

4.2. Einfluß der Ischämie auf die Permeabilität der Mitochondrienmembran

In der vorliegenden Arbeit wurde die Veränderung der Permeabilität der Mitochondrienmembran in Abhängigkeit von der Ischämietemperatur bei einer Ischämiedauer von 40 min für die Moleküle NAD und Oxalacetat untersucht. Beide Verbindungen können die intakte Mitochondrienmembran nicht durchdringen.

Es zeigt sich nach einer Ischämiezeit von 40 min bei 37 °C eine signifikante ($p \leq 0,01$) Steigerung der Permeabilität der Mitochondrienmembran für NAD auf ca. 380 % des Kontrollwertes. (siehe Tabelle 3 S. 39 und Abb. 11 S. 40)

Bei einer Ischämietemperatur von 4 °C dagegen ist unter sonst gleichen Bedingungen der "NAD-Ausstrom" gegenüber der Kontrolle (0 min Ischämie) nicht erhöht. Auch dieser Befund bestätigt eindrucksvoll den protektiven Effekt der Absenkung der Gewebstemperatur während der Ischämiedauer. Die Vermutung, daß Cofaktoren wie NAD/NADH ischämiebedingt durch die Membran permeieren, wird auch von den Autoren Mergner et al. (29) geäußert.

Was die Veränderung der Oxalacetat-Permeabilität der Mitochondrienmembran betrifft, so konnten hierzu keine eindeutigen Ergebnisse hinsichtlich der Schutzwirkung der Temperaturabsenkung im ischämischen Gewebe erzielt werden. Es zeigt sich generell ein Trend zur Zunahme der Permeabilität für Oxalacetat unter Ischämiebedingungen, der für eine Schädigung der Membran spricht. (siehe Tabelle 3 S. 39)

Die Ergebnisse weisen somit daraufhin, daß es durch Ischämie zwar zu einer Schädigung der Mitochondrienmembran kommt, die aber offensichtlich nicht den Aufbau eines Protonengradienten verhindert, da keine Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung beobachtet wird.

4.3. Untersuchung des Mechanismus der ischämischen Schädigung der Rattenlebermitochondrien

Zunächst wurde untersucht, ob durch Vorbehandlung der Versuchstiere mit Chlorpromazin eine Schutzwirkung gegen ischämische Schädigung erreicht werden kann, wie es von Mitnacht, Sherman und Farber (6) und von Chien et al. (13) in Reperfusionsversuchen beobachtet wurde.

Es zeigt sich, daß ohne Reperfusion des Organs bei keinem der untersuchten Funktionsparameter außer der NAD-Permeabilität der Mitochondrienmembran ein protektiver Effekt nachzuweisen ist. (siehe Tabellen 4; 5 S.42,43) Chlorpromazin kann also ischämische Schädigungen der Lebermitochondrien unter den beschriebenen Versuchsbedingungen nicht verhindern.

Dies stimmt mit den Ergebnissen der oben genannten Autorengruppen überein, die nur dann durch Chlorpromazinvorbehandlung der Versuchstiere eine vollständige Reversibilität der ischämischen Funktionseinschränkungen erreichten, wenn die Leber nach der Ischämieperiode reperfundiert wurde.

Von Interesse war es weiterhin, die Wirkung von Ca^{2+} -Ionen auf die Funktion von Lebermitochondrien aus Kontrolltieren zu untersuchen, da die beiden zuletzt genannten Forschungsgruppen die protektive Wirkung von Chlorpromazin bei der Reperfusion des ischämisch geschädigten Organs auf dessen Eigenschaft als Calciumantagonist zurückführen. Sie vertreten die Meinung, daß die Irreversibilität der ischämischen Schädigung auf einer starken Erhöhung der Ca^{2+} -Permeabilität der Mitochondrienmembran beruht und es damit bei der Reperfusion zu einem erheblichen Calcium-Einstrom in das Organell kommt, der seinerseits zu einer funktionellen Schädigung des Mitochondriums führt.

Die erzielten Ergebnisse (siehe Tabelle 6 S.45) zeigen, daß es durch stufenweise Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Inkubationsansatz mit beiden Substraten zu einem zunehmenden Verlust der Atmungskontrolle kommt. Es erweist sich, daß Ca^{2+} -Ionen die Sauerstoffverbrauchsrate bei Verwendung von Succinat als Substrat weniger beeinflussen als dies bei Verwendung von Malat der Fall ist. Dies gilt für Ca^{2+} -Konzentrationen bis $40 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1}$. (Bei dieser Ca^{2+} -Konzentration beträgt der Atmungskontrollquotient mit Succinat 1,76 , während er mit Malat auf 1,00 abgefallen ist)

Höhere Konzentrationen von Ca^{2+} -Ionen ($75 \text{ nmol} \times \text{mg}^{-1}$) haben bei beiden Substraten eine grundsätzlich unterschiedliche Wirkung.

Mit Succinat kommt es auch ohne ADP zu einem maximalen Sauerstoffverbrauch, der durch ADP-Zugabe nicht mehr gesteigert werden kann. Offensichtlich liegt eine vollständige Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung vor. Diese Vorstellung wird dadurch unterstützt, daß durch den Entkoppler 2,4 - DNP der Sauerstoffverbrauch nicht mehr erhöht werden kann.

Mit Malat als Substrat führen steigende Ca^{2+} -Konzentrationen zu einer Verringerung des Sauerstoffverbrauchs in "state 3", die Sauerstoffverbrauchsrate in "state 4" bleiben im Bereich der Kontrollwerte (kein Zusatz von CaCl_2). Auch hier führt die Zugabe von 2,4 - DNP nicht zu einer zusätzlichen Stimulierung des Sauerstoffverbrauchs.

Die primäre Wirkung von Ca^{2+} -Ionen scheint demnach eine Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung zu sein, wie es auch von Rossi und Lehninger (33) beschrieben wurde. Dies gilt sowohl bei der Verwendung von Succinat als auch von Malat als Substrat.

Zusätzlich scheint durch Ca^{2+} -Ionen der Elektronentransport zwischen den ersten Redoxpaaren der Atmungskette (NAD/NADH und FMN/FMNH) gehemmt zu werden.

Unter der Wirkung von Ca^{2+} -Ionen kommt es außerdem zu einer vermehrten Oxidation des zugesetzten NADH zu NAD auch ohne ADP im Inkubationsansatz. Da die Sauerstoffverbrauchsrate in "state 4" mit Malat als Substrat nicht ansteigen kann, die vermehrte NAD -Bildung nicht auf einen erhöhten Durchsatz durch den Malat/Aspartat-Zyklus beruhen. Auch die unterschiedliche Inkubationstemperatur bei der Messung des Sauerstoffverbrauchs (25°C) und der Aktivität des Wasserstoffshuttle (37°C) reicht nicht aus, um die Diskrepanz zwischen Sauerstoffverbrauch und den entsprechenden NAD -Bildungsraten zu erklären.

Es kommt offensichtlich zu einer durch Ca^{2+} -Ionen bewirkten NAD -Bildung, die unabhängig von der Atmungskette und dem Malat/Aspartat-Zyklus ist. Diese unspezifische NAD -Bildung ist an die Anwesenheit der für die Funktion des Shuttle notwendigen Substrate (Malat; Glutamat; Aspartat) und Enzyme (MDH ; GOT) gebunden.

Untersuchungen über die Veränderungen der Membranpermeabilität in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration ergaben, daß die Oxalacetat-Permeabilität dosisabhängig zunimmt, während die NAD-Permeabilität im Gegensatz zur ischämischen Schädigung nahezu unverändert bleibt.

(siehe Tabelle 6 S. 45)

Die von Chien et al. (13) gemachte Annahme, daß der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen die charakteristischen Veränderungen der ischämischen Schädigung hervorruft, trifft somit nicht zu, da die vorliegenden Ergebnisse für eine Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung durch Calcium sprechen, ein Effekt, der, wie oben ausgeführt, bei der ischämischen Schädigung nicht auftritt.

Ein weiterer Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist die Wirkung von Fettsäuren auf die Funktion von Rattenlebermitochondrien, da die Autoren Boime, Smith und Hunter (5 ; 8) von einer gesteigerten Lipolyse in den Mitochondrien als Folge der Ischämie berichten. Die dabei freigesetzten Fettsäuren sind nach ihrer Meinung für die Funktionseinschränkung des Mitochondriums verantwortlich. Sie erklären die von ihnen beobachtete protektive Wirkung von Rinderalbuminserum gegen ischämische Schädigungen durch dessen Bindungsvermögen für die durch die Ischämie freigesetzten Fettsäuren.

Die zu dieser Fragestellung durchgeführten Versuche zeigen, daß es bereits bei der niedrigsten Na-Oleat Konzentration im Inkubationsansatz zu einem vollständigen Verlust der Atmungskontrolle kommt. (siehe Tabelle 6 S. 45) Dieser ist hauptsächlich auf einen Anstieg der Sauerstoffverbrauchsraten in "state 4" zurückzuführen.

Es handelt sich also um eine Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung. Diese Interpretation wird durch die Ergebnisse der Autoren Wojtczak und Zaluska (31) bestätigt, die von einer vollständigen Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung und einer maximalen Aktivierung der "state 4"-Atmung bei einer Oleat-Konzentration von 25 - 50 nmol x mg^{-1} berichten. Noch höhere Konzentrationen führen nach ihren Vorstellungen zur Desintegration bzw. zur Lyse der Mitochondrien, was die verminderten Atmungs-raten bei Verwendung einer Konzentration von 180 nmol Na-Oleat x mg^{-1} erklären kann. (siehe Tabelle 6 S. 45)

Auch die Wasserstoffshuttle-Aktivität mit und ohne ADP im Inkubationsansatz nimmt mit steigender Oleat-Konzentration bis auf $0,0 \text{ nmol NAD} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ab. (siehe Abb.12 S.47)

Zusatz von Na-Oleat führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Mitochondrienmembran für NAD, was auf eine Schädigung der Membran hinweist.

Aus den vorliegenden Resultaten und den Beobachtungen von Wojtczak und Zaluska (31) erscheint es fragwürdig, ob die Freisetzung von Fettsäuren das entscheidende Ereignis bei der ischämischen Schädigung der Mitochondrien darstellt, denn im Gegensatz zur Ischämie führt die in vitro Inkubation mit Na-Oleat zu einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung.

Die erhaltenen Ergebnisse beinhalten zwar keine weiterführenden Informationen über den der ischämischen Schädigung zugrundeliegenden Mechanismus, sie zeigen jedoch eindeutig, daß die Freisetzung von Fettsäuren bzw. der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen nicht die Ursache der ischämiebedingten Funktionseinschränkung der Mitochondrien sein können, wie es von einigen Autoren in der nachfolgenden Literaturübersicht zum Ausdruck gebracht wird.

Bei der Gegenüberstellung der vorliegenden Ergebnisse mit denen anderer Autoren muß berücksichtigt werden, daß die Arbeiten oft nur schwer vergleichbar sind, da die jeweiligen Rahmenbedingungen für die Versuchsdurchführung teilweise recht uneinheitlich sind. Hierzu gehören unter anderem die Art der Induzierung der Ischämie, die Ischämiebedingungen, die Präparationsverfahren, sowie die Zusammensetzung der verwendeten Präparationsmedien.

Die Autoren Boime, Smith und Hunter veröffentlichten zwei Arbeiten, die in diesem Zusammenhang interessant erscheinen. In der ersten von 1968 (5) berichten sie von dem protektiven Effekt von Rinderalbuminserum im Hinblick auf ischämische Funktionsstörungen in Rattenlebermitochondrien.

In einer Versuchsserie erzielten sie das Ergebnis, daß nach einer bis zu drei Stunden dauernden Ischämie sowohl der RCR als auch der P/O - Quotient fast vollständig unverändert bleibt, falls dem Inkubationsmedium Rinderalbuminserum zugesetzt wurde und die Ischämietemperatur 24 °C betrug.

Dagegen sank der RCR bei einer Versuchsreihe mit einer Ischämietemperatur von 37 °C mit Rinderalbuminserum bzw. bei einer Ischämietemperatur von 24 °C ohne Rinderalbuminserum schnell ab.

Sie postulieren, daß die Freisetzung von Fettsäuren für die ischämischen Funktionsstörungen verantwortlich ist und daß das Bindungsvermögen von Rinderalbuminserum für Fettsäuren dessen protektive Wirkung erklärt.

In einer Publikation von 1970 (8) berichtet die gleiche Autorengruppe, daß nach einer zweistündigen Ischämie bei 38 °C in Rattenlebermitochondrien der Gehalt an freien Fettsäuren auf das sechs- bis siebenfache der Kontrollwerte ansteigt und daß es zu einem der ischämischen Schädigung vergleichbaren Absinken des RCR kommt, wenn Mitochondrien aus Kontrolltieren mit entsprechenden Mengen an freien Fettsäuren versetzt werden.

Nach den Ergebnissen der genannten Autoren ist Rinderalbuminserum in der Lage, den Gehalt an freien Fettsäuren um 70 % zu senken und den Rückgang des RCR in gewissen Grenzen reversibel zu gestalten.

Es wird ebenso von einer Abnahme der Konzentration an Membranphospholipiden berichtet. Betroffen sind hiervon Phosphatidyläthanolamin und noch stärker Cardiolipin, während der Gehalt an Phosphatidylcholin praktisch unverändert bleibt.

Die Autoren leiten hieraus die Theorie ab, daß sich die ischämischen Funktionsstörungen der Mitochondrien in zwei Phasen untergliedern lassen. Eine frühe, durch Zugabe von Rinderalbuminserum reversible Schädigung, die vor allem durch die verstärkte Lipolyse charakterisiert ist und eine auf Zugabe von Rinderalbuminserum irreversible Spätphase, die durch die Abnahme des Gehaltes an Membranphospholipiden, hauptsächlich Cardiolipin, gekennzeichnet ist.

Auf den Rückgang des Gehaltes an Phospholipiden in den ischämischen Mitochondrien geht auch die Autorengruppe Chien et al. (13) ein.

Sie kommen zu dem Ergebnis, daß nach dreistündiger Ischämie in Rattenlebermitochondrien der Gehalt an Phospholipiden auf etwa 40 - 55 % des Ausgangswertes zurückgeht und die Halbwertszeit der Membranlipide, die normalerweise ca. 24 Stunden beträgt, auf 2 - 4 Stunden absinkt. Weiterhin beobachteten sie eine ischämiebedingte Hemmung der Glucose-6-Phosphatase und der Ca^{2+} -Ionen-Pumpen-Aktivität sowie eine 25 - 50-fache Steigerung der passiven Ca^{2+} -Permeabilität der Mitochondrienmembran. Außerdem wurde festgestellt, daß eine Behandlung der Mitochondrien aus Kontrolltieren mit "Naja Naja Phospholipase A_2 " ähnliche Funktionsstörungen wie bei ischämiegeschädigten Mitochondrien hervorruft. Hieraus wird die Vorstellung abgeleitet, daß die durch die starke Erhöhung der Ca^{2+} -Permeabilität bewirkte, hohe endomitochondriale Ca^{2+} -Konzentration während der Phase der Reperfusion eine Aktivierung der membrangebundenen Phospholipase hervorruft und es somit über den Abbau von Membranphospholipiden zu einer fortschreitenden Schädigung der Membran kommt.

Die von den Autoren beschriebene Schutzwirkung von Chlorpromazin führen diese auf dessen Eigenschaft als Calciumantagonist bzw. als direkten Phospholipasehemmer zurück. Sie berichten weiterhin, daß es durch eine in vitro Inkubation von Lebermitochondrien aus Kontrolltieren mit einem Überschuß an Ca^{2+} -Ionen zu einer Abnahme der Phospholipide in den Mitochondrien kommt, der auch in seinem zeitlichen Verlauf dem Ablauf bei der in vivo Ischämie sehr ähnlich ist. Außerdem bewirkt eine Zugabe von Phosphatidylcholin in vitro eine Normalisierung der Ca^{2+} -Permeabilität der ischämisch geschädigten Mitochondrienmembran.

Mitnacht, Sherman und Farber (6) berichten ebenfalls von der Schutzwirkung von Chlorpromazin gegen ischämische Schädigung. In einer Versuchsserie beobachteten sie in Rattenlebermitochondrien nach dreistündiger Ischämie einen vollständigen Verlust der Atmungskontrolle, einen Rückgang der Aktivität der Adeninnukleotid-Translokase, eine Abnahme zumindest des Häm-Anteils von Cytochrom aa_3 und $\text{c}_1 + \text{c}_2$, eine Abnahme der Fähigkeit den Sauerstoffverbrauch durch den Entkoppler 2,4 - DNP zu steigern, eine Veränderung der Ultrastruktur, vor allem ein Anschwellen

des Organells und eine Reduzierung des Gehaltes der $M_r = 83,000$ Proteinbande.

Keine dieser Veränderungen ist nach ihren Beobachtungen durch Reperfusion des Organs reversibel.

In einer weiteren Versuchsserie wurden die gleichen Ischämiebedingungen gewählt, aber die Versuchstiere mit Chlorpromazin vorbehandelt.

Es zeigten sich die gleichen Schädigungen wie bei der ersten Versuchsserie, jedoch sind diese durch Reperfusion des Organs komplett reversibel.

Die Autoren kommen zu der Schlußfolgerung, daß die metabolischen Folgen der Reperfusion, speziell der dabei stattfindende Ca^{2+} -Einstrom, die eigentliche Ursache für die irreversiblen Schäden der Mitochondrienfunktion darstellen.

Rhodes, DePalma und Druet (7) untersuchten Rattenlebermitochondrien nach einstündiger Ischämie. Sie fanden, daß der RCR und der P/O-Quotient gegenüber den Kontrollwerten absank, während der endomitochondriale Laktat-Spiegel anstieg. Nach anschließender 30minütiger Reperfusion kam es zu einem begrenzten Rückgang des Laktat-Gehaltes in den Mitochondrien, der jedoch über dem Normalwert blieb. Bei Verwendung von Succinat als Substrat beobachteten die Autoren eine Reversibilität der beschriebenen Funktionsstörungen durch Reperfusion, was bei Verwendung von α - Ketoglutarat nicht der Fall war. Hieraus leiten sie den Schluß ab, daß das NAD/NADH-System im Hinblick auf die Ischämie einen empfindlicheren Teil der Atmungskette darstellt als das FMN/FMNH-System.

Baue und Sayeed (9) berichten von einem Rückgang des Atmungskontrollquotienten nach 90minütiger Ischämie in Rattenlebermitochondrien bei Verwendung von α - Ketoglutarat als Substrat. Der P/O-Quotient ist hierbei nicht meßbar, da keine vollständige Umsetzung von ADP zu ATP stattfindet. Dagegen ergeben sich bei Verwendung von Succinat als Substrat weder beim Atmungskontrollquotienten noch beim P/O-Quotienten signifikante Unterschiede zu den Werten, die aus Kontrolltieren entnommen wurden.

Daniel und Beaudoin (11) untersuchten Rattenlebermitochondrien nach einer Ischämiedauer bis zu zwei Stunden und beobachteten, daß es sowohl zu einem Absinken des RCR als auch des P/O-Quotienten kommt. Die von den Autoren Boime, Smith und Hunter (5 ; 8) festgestellte Schutzwirkung von Rinderalbuminserum konnten sie nur in geringem Umfang reproduzieren. Die Ergebnisse dieser beiden Forscher für den RCR bei Verwendung von Succinat als Substrat zeigen bei den Kontrolltieren bzw. nach Ischämie eine gute Übereinstimmung mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit.

Hems und Brosnan (12) beschäftigten sich mit dem zeitlichen Verlauf der Veränderungen des Gehaltes an Intermediaten der Glykolyse in Rattenlebermitochondrien in Abhängigkeit von der Ischämie. Sie fanden eine Abnahme des ATP-Spiegels und eine Akkumulation von AMP und anorganischem Phosphat, sowie eine Erhöhung des Laktat-Spiegels und eine Aktivierung der Glykogenolyse.

Mela, von Bacalzo und Miller (10) beobachteten nach der Auslösung eines hypovolämischen- bzw. Endotoxin-Schocks in Versuchsratten in deren Lebermitochondrien eine Zunahme der "state 4"-Atmung und eine Abnahme der Sauerstoffverbrauchsraten in "state 3". Weiterhin wird berichtet, daß die Mitochondrien infolge des Schockzustandes Mg^{2+} -Ionen verlieren. Die Autoren werten dies als Zeichen einer geschwächten Membranstruktur, die auch durch eine Anschwellung der Organellen erkennbar wird und welche die entscheidende Rolle bei der ischämischen Funktionsstörung der Mitochondrien spielt.

Wojtczak und Zaluska (31) berichten von der Auswirkung der in vitro Inkubation von Rattenlebermitochondrien mit Oleat. Nach ihren Ergebnissen kommt es bei einer Konzentration von 25 - 50 nmol Oleat $\times$ mg^{-1} zu einer maximalen Aktivierung der "state 4"-Atmung und damit zu einer vollständigen Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung. Außerdem bewirkt nach ihren Beobachtungen eine Oleat-Konzentration von 50 nmol $\times$ mg^{-1} eine Anschwellung der Organellen und bei einer Konzentration von 500 nmol Oleat $\times$ mg^{-1} kommt es zur Desintegration bzw. zur Lyse der Mitochondrien.

Kamiyama, Ozawa und Honjo (16) beschäftigten sich mit der Veränderung der Phosphorylierungsaktivität in der regenerierenden Leber. Hierzu untersuchten sie die Mitochondrien aus der Restleber nach subtotaler Hepatektomie bei Kaninchen. Sie fanden, daß sich die Phosphorylierungsaktivität in den ersten 12 Stunden nach dem Eingriff in der Restleber auf ca. 170 % des Ausgangswertes erhöhte und innerhalb von sieben Tagen wieder auf den Normalwert zurückging. Allgemein ergibt sich eine umgekehrte Korrelation zwischen der Phosphorylierungsaktivität und dem energetischen Zustand des Mitochondriums.

Rossi und Lehninger (33) untersuchten die Auswirkung von Ca^{2+} -Ionen auf den Sauerstoffverbrauch und die oxidative Phosphorylierung in Rattenlebermitochondrien. Nach ihren Ergebnissen führen niedrige Calcium-Konzentrationen zu einer vorübergehenden Zunahme des Sauerstoffverbrauches der Mitochondrien, die nicht von der Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen, anorganischem Phosphat oder ADP abhängig ist und welche durch Oligomycin nicht beeinflußt wird. Außerdem kommt es zur Akkumulation von Calcium durch die Mitochondrien, die jedoch nicht zu einem Verlust der Atmungskontrolle oder zu einer Schädigung des phosphorylierenden Systems führt.

In Gegenwart von anorganischem Phosphat führen Ca^{2+} -Ionen zu einer anhaltenden Stimulation des Sauerstoffverbrauches und es wird nur eine sehr geringe Menge Calcium gespeichert. Werden ADP und Ca^{2+} -Ionen gleichzeitig in den Inkubationsansatz gegeben, so wird die Atmung zuerst ausschließlich durch Calcium stimuliert. Erst wenn die Ca^{2+} -Akkumulation abgeschlossen ist, aktiviert ADP den Sauerstoffverbrauch und wird dabei phosphoryliert. Sehr hohe Calcium-Konzentrationen führen nach Ansicht der Autoren zu einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung, jedoch nicht zu einer Störung der stöchiometrischen Beziehung zwischen der Ca^{2+} - bzw. Phosphat-Speicherung einerseits und dem Elektronentransport in der Atmungskette andererseits.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß die Ischämie eine erhebliche Schädigung der Mitochondrienfunktion nach sich zieht, deren Ausmaß wesentlich von den jeweiligen Ischämiebedingungen abhängig ist. Über den Mechanismus, der diese Schädigung hervorruft, gibt es jedoch noch keine abschließend gültige Erklärung.

Die Mehrzahl der genannten Autoren führt, wie berichtet, die Schädigungen der Mitochondrienfunktion auf einen Anstieg der Ca^{2+} -Permeabilität der Membran und eine dadurch bewirkte vermehrte Freisetzung von Fettsäuren bzw. einem dadurch gesteigerten Abbau von Phospholipiden zurück. Die Membranschädigung wird also als entscheidender Faktor angesehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen zwar, daß es infolge der Ischämie zu einer Permeabilitätssteigerung der Mitochondrienmembran für bestimmte Moleküle kommt, jedoch scheint dies nur in begrenztem Umfang der Fall zu sein.

Entscheidend ist die Feststellung, daß die Ausbildung eines Protonengradienten an der Membran trotz Ischämie möglich ist, es also nicht zu einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung kommt.

Es scheint, daß weniger die Membranschädigung als vielmehr die Schädigung des Elektronentransportsystems der Atmungskette bzw. des ATP-synthetisierenden Systems die Ursache für die ischämiebedingten Funktionseinschränkungen des Mitochondriums darstellt. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse, die bei der Untersuchung der Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus erzielt wurden, bestätigt.

Die von mehreren Autoren als Bestätigung ihrer Theorie angeführten Wirkungen einer in vitro Inkubation der Mitochondrien mit einem Überschuß an Ca^{2+} -Ionen bzw. Fettsäuren erscheinen fragwürdig, da diese Substanzen nach den vorliegenden Untersuchungen bzw. nach den Ergebnissen anderer Forscher (31 ; 33) zu einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung führen, also nicht zur gleichen Art der Schädigung, die infolge einer Ischämie auftritt.

Eine deutliche Verminderung der ischämischen Schädigung kann durch Absenkung der Gewebstemperatur auf 4°C erzielt werden. Eine Erklärung dieses protektiven Effektes scheint einfach in der allgemeinen Verlangsamung chemischer bzw. biochemischer Vorgänge bei der Absenkung der

Temperatur zu liegen. Es kommt somit auch zu einer Verlangsamung der biochemischen Prozesse, die zu den beschriebenen funktionellen Schäden des Mitochondriums führen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Ischämie bei einer Temperatur von 37 °C und 4 °C auf die Funktion von Rattenlebermitochondrien untersucht. Als Parameter dienten die mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate in Ab- und Anwesenheit von ADP, der Atmungskontrollquotient, die Aktivität des Wasserstoffshuttle über den Malat/Aspartat-Zyklus, sowie die Permeabilitätsänderung der Mitochondrienmembran für Oxalacetat und NAD. Als wasserstoffliefernde Substrate wurden Malat bzw. Succinat verwendet. Weiterhin wurden Versuche zum Mechanismus der ischämischen Schädigung vorgenommen.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- 1) Nach einer Ischämiedauer von 40 min bei 37 °C kommt es zu einem signifikanten Rückgang ($p \leq 0,01$) der Atmungskontrolle auf ca. 53 % des Kontrollwertes bei Verwendung von Succinat als Substrat; fand Malat als Substrat Verwendung, so kam es ebenfalls zu einem signifikanten Abfall ($p \leq 0,01$) der Atmungskontrolle auf ca. 38 % des Ausgangswertes. Dies ist ausschließlich auf den Rückgang der ADP-induzierten Atmung zurückzuführen, da sich in Abwesenheit von ADP die Sauerstoffverbrauchsrate praktisch nicht ändern.
- 2) Die Aktivität des Wasserstoffshuttle über den Malat/Aspartat-Zyklus wird durch die 40minütige Ischämie bei 37 °C erheblich beeinträchtigt. Es zeigt sich eine hohe Korrelation mit den Sauerstoffverbrauchsrate bei Verwendung von Malat als Substrat. Sowohl die "ADP-bedingte Shuttle-Aktivität" als auch die "ADP-bedingten Sauerstoffverbrauchsrate" gehen auf ca. 27 % des Kontrollwertes zurück.

- 3) Es kommt nicht zu einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung durch die beschriebenen Ischämiebedingungen.
- 4) Sowohl die Permeabilität für NAD als auch für Oxalacetat nimmt nach einer Ischämiedauer von 40 min bei 37 °C gegenüber den Kontrollwerten zu, wobei jedoch nur die Zunahme der NAD-Permeabilität statistisch signifikant ($p \leq 0,01$) ist.
- 5) Der protektive Effekt der Absenkung der Gewebstemperatur auf 4 °C während der Ischämiedauer von 40 min zeigt sich in folgenden Daten: Mit beiden Substraten kommt es zu keinem statistisch signifikanten ($p \leq 0,01$) Abfall des Atmungskontrollquotienten und der Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus. Die "ADP-bedingte Sauerstoffverbrauchsrate" mit Malat als Substrat sinkt nur auf ca. 86 % und die "ADP-bedingte Shuttle-Aktivität" lediglich auf ca. 89 % des Kontrollwertes ab. Nur die Permeabilität der Mitochondrienmembran für Oxalacetat ist signifikant ($p \leq 0,01$) erhöht, während die NAD-Permeabilität auf dem $p \leq 0,01$ Niveau statistisch keinen Unterschied zum Kontrollwert zeigt.
- 6) Die Vorbehandlung der Versuchstiere mit intraperitoneal verabreichtem Chlorpromazin ($25 - 100 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ Körpergewicht) führt zu keiner Schutzwirkung im Hinblick auf ischämische Funktionsstörungen des Mitochondriums.
- 7) Die in vitro Inkubation von Mitochondrien aus Kontrolltieren sowohl mit einem Überschuß an Ca^{2+} -Ionen als auch mit Na-Oleat führt zu erheblichen Funktionsstörungen der Mitochondrien, die jedoch hauptsächlich in einer Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung bestehen.
Der Mechanismus der ischämiebedingten Schädigung des Mitochondriums geht demnach nicht mit einem vermehrten Einstrom von Ca^{2+} -Ionen oder einer Freisetzung von Fettsäuren einher.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Absenkung der Gewebstemperatur auf 4 °C während der Ischämiedauer von 40 min eine weitgehende Verhütung der primären Ischämieschäden bewirkt.

Die Resultate der Versuche werden im Hinblick auf den Mechanismus der ischämischen Schädigung im Zusammenhang mit den Arbeiten anderer Autoren diskutiert.

6. A N H A N G

Tabellen der einzelnen Versuchsergebnisse:

Sauerstoffverbrauchsrate und Wasserstoffshuttle-Aktivität über den
Malat/Aspartat-Zyklus in Rattenlebermitochondrien nach

0 min Ischämie (Kontrolle)

40 min Ischämie bei 37 °C

40 min Ischämie bei 4 °C

Einfluß der Ischämie auf den "NAD-Ausstrom" aus Rattenlebermitochondrien
nach einer Ischämiedauer von

0 min (Kontrolle)

40 min bei 37 °C

40 min bei 4 °C

Einfluß der Ischämie auf die Oxalacetat-Permeabilität ("Q") von Mito-
chondrienmembranen nach einer Ischämiedauer von

0 min (Kontrolle)

40 min bei 37 °C

40 min bei 4 °C

Tabelle 7 : Sauerstoffverbrauchsrate und Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus in Rattenleber-mitochondrien nach 0 min Ischämie

Versuch-Nr.	Sauerstoffverbrauchsrate Substrat: Succinat+Rotenone				Sauerstoffverbrauchsrate Substrat: Malat+Glutamat				Wasserstoffshuttle-Aktivität	
	"state 4"	"state 3"	RCR	P/O	"state 4"	"state 3"	"ADP-bed."	RCR	-ADP	+ADP
1	7,6	24,8	3,26	2,44	2,3	20,7	18,4	9,00	19,6	34,7
2	5,5	18,3	3,33	2,65	2,9	18,8	15,9	6,48	13,5	32,9
3	6,8	21,2	3,12	2,68	4,2	23,2	19,0	5,52	15,6	34,6
4	8,7	26,1	3,00	2,37	3,3	20,7	17,4	6,27	12,3	32,5
5	7,2	25,5	3,54	2,12	2,9	20,1	17,2	6,93	15,2	35,6
6	7,5	23,2	3,09	2,27	3,2	20,7	17,5	6,47	12,9	32,2
$\bar{x}$	7,2	23,2	3,22	2,42	3,1	20,7	17,6	6,78	14,9	33,8
S	1,1	3,0	0,20	0,22	0,6	1,4	1,1	1,18	2,7	1,4
SEM	0,4	1,2	0,03	0,09	0,2	0,6	0,4	0,48	1,1	0,6
$V_{\%}$	15,3	12,9	6,21	9,09	19,4	6,8	6,3	17,40	18,1	4,1

Die Sauerstoffverbrauchsrate sind in $\text{nmol O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Mitochondrienprotein angegeben.

Die Wasserstoffshuttle-Aktivität ist in $\text{nmol NAD} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Mitochondrienprotein ausgedrückt; bei Anwesenheit von ADP betrug dessen Konzentration $4 \text{ nmol} \times \text{l}^{-1}$ im Inkubationsansatz.

Die Bedingungen für "state 4" und "state 3", sowie die Berechnung der "ADP-bed. Sauerstoffverbrauchsrate", der "Respiratory Control-Ratio" (RCR), des "P/O" und der "ADP-bed. Wasserstoffshuttle-Aktivität" sind unter Methoden beschrieben.

Tabelle 8 : Sauerstoffverbrauchsrate und Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus in Rattenleber-mitochondrien nach 40 min Ischämie bei einer Ischämietemperatur von 37 °C

Versuch-Nr.	Sauerstoffverbrauchsrate			Sauerstoffverbrauchsrate			Wasserstoffshuttle-Aktivität	
	Substrat: Succinat+Rotenone "state 4"	"state 3"	RCR	Substrat: Malat+Glutamat "state 4"	"state 3"	"ADP-bed."	RCR	"ADP-bed."
1	4,7	7,7	1,64	4,2	11,6	7,4	2,76	8,7
2	5,6	8,9	1,59	2,3	6,3	4,0	2,74	3,7
3	7,0	11,1	1,59	3,2	6,5	3,3	2,03	1,2
4	7,2	12,6	1,75	3,9	8,2	4,3	2,10	7,2
5	7,3	12,8	1,75	2,5	6,9	4,4	2,76	3,8
6	7,2	13,4	1,86	2,1	6,0	3,9	2,86	5,4
$\bar{x}$	6,5	11,1	1,70	3,0	7,6	4,6	2,54	5,0
s	1,1	2,3	0,11	0,9	2,1	1,4	0,37	2,7
SEM	0,4	0,9	0,04	0,4	0,9	0,6	0,15	1,1
V_g	16,9	20,7	6,47	30,0	27,6	30,4	14,57	54,0

Die Sauerstoffverbrauchsrate sind in $\text{nmol O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Mitochondrienprotein angegeben.

Die Wasserstoffshuttle-Aktivität ist in $\text{nmol NAD} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Mitochondrienprotein ausgedrückt; bei Anwesenheit von ADP

betrug dessen Konzentration 4 nmol l^{-1} im Inkubationsansatz.

Die Bedingungen für "state 4" und "state 3", sowie die Berechnung der "ADP-bed. Sauerstoffverbrauchsrate", der "Respiratory-Control-Ratio" (RCR) und der "ADP-bed. Wasserstoffshuttle-Aktivität" sind unter Methoden beschrieben.

Tabelle 9 : Sauerstoffverbrauchsrate und Wasserstoffshuttle-Aktivität über den Malat/Aspartat-Zyklus in Rattenleber-mitochondrien nach 40 min Ischämie bei einer Ischämietemperatur von 4 °C

Versuch-Nr.	Sauerstoffverbrauchsrate			Sauerstoffverbrauchsrate			Wasserstoffshuttle-Aktivität	
	Substrat: Succinat+Rotenone "state 4"	"state 3"	RCR	Substrat: Malat+Glutamat "state 4"	"state 3"	"ADP-bed."	-ADP	+ADP "ADP-bed."
1	9,2	24,8	2,70	2,6	15,3	12,7	14,0	34,9
2	10,4	24,8	2,38	3,9	15,9	12,0	13,9	32,2
3	7,9	18,9	2,39	3,4	14,3	10,9	10,0	27,6
4	8,9	28,8	3,24	4,6	25,4	20,8	18,0	34,2
5	9,0	26,7	2,97	3,9	20,4	16,5	15,6	26,5
6	8,0	25,6	3,20	3,8	21,8	18,0	17,9	35,2
$\bar{x}$	8,9	24,9	2,81	3,7	18,9	15,2	14,9	31,8
s	0,9	3,3	0,38	0,7	4,4	3,9	3,0	3,8
SEM	0,4	1,3	0,16	0,3	1,8	1,6	1,2	1,6
V _%	10,1	13,3	13,52	18,9	23,3	25,7	20,1	12,0
								19,5

Die Sauerstoffverbrauchsrate sind in $\text{nmol O}_2 \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Mitochondrienprotein angegeben.

Die Wasserstoffshuttle-Aktivität ist in $\text{nmol NAD} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Mitochondrienprotein ausgedrückt; bei Anwesenheit von ADP betrug dessen Konzentration $4 \text{ mmol} \times \text{l}^{-1}$ im Inkubationsansatz.

Die Bedingungen für "state 4" und "state 3", sowie die Berechnung der "ADP-bed. Sauerstoffverbrauchsrate", der "Respiratory Control-Ratio" (RCR) und der "ADP-bed. Wasserstoffshuttle-Aktivität" sind unter Methoden beschrieben.

Tabelle 10 : Einfluß der Ischämie auf den "NAD-Ausstrom" aus Rattenlebermitochondrien

Ischämiedauer :		0 min	40 min bei 37 °C	40 min bei 4 °C
		"NAD-Ausstrom"	"NAD-Ausstrom"	"NAD-Ausstrom"
Versuch- Nr.				
1		4,4	19,9	3,1
2		2,6	10,8	3,4
3		4,5	18,9	4,8
4		4,6	12,1	1,7
5		3,5	9,4	1,4
6		2,6	14,1	2,9
$\bar{x}$		3,7	14,2	2,9
s		0,9	4,3	1,2
SEM		0,4	1,8	0,5
V_{95}		24,3	30,3	41,4

Definition und Berechnung des "NAD-Ausstrom", der als Parameter für die NAD-Permeabilität der Mitochondrienmembran gilt, sind unter Methoden beschrieben.

Der "NAD-Ausstrom" ist in $\text{nmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ Mitochondrienprotein angegeben.

Tabelle 11 : Einfluß der Ischämie auf die Oxalacetat-Permeabilität ("Q") von Mitochondrienmembranen.

Ischämiedauer	0 min	40 min bei 37 °C	40 min bei 4 °C
Versuch- Nr.	"Q"	"Q"	"Q"
1	0,26	0,36	0,49
2	0,35	0,44	0,67
3	0,29	0,48	0,58
4	0,45	0,44	0,46
5	0,28	0,54	0,47
6	0,33	0,44	0,54
$\bar{x}$	0,33	0,45	0,54
s	0,07	0,06	0,10
SEM	0,03	0,02	0,04
V%	21,21	13,33	18,52

Definition und Berechnung von "Q" sind unter Methoden beschrieben.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) W.J. Mergner, M.W. Smith, B.F. Trump
"Studies on the Pathogenesis of Ischemic Cell Injury"
XI P/O Ratio and Acceptor Control
Virchows Arch. B Cell Path. 26 , 17-26 (1977)
- 2) R.B. Jennings, P.B. Herdson, H.M. Sommers
"Structural and functional abnormalities in mitochondria isolated
from ischemic dog myocardium"
Lab. Invest. 20 , 548-557 (1969)
- 3) B.F. Trump, B.P. Croker, W.J. Mergner
"The role of energy metabolism, ion and water shifts in the patho-
genesis of cell injury"
In: Cell Membranes: Biological and Pathological Aspects
(G.W. Richter, D.G. Scarpelli)
pp. 84-128 Baltimore: Williams and Wilkins 1971
- 4) B.F. Trump, W.J. Mergner
"Cell Injury"
In: The Inflammatory Process Vol. I , Second Edition
(B.W. Zwiefach, L. Grant, R.T. McClusky)
pp. 115-257 London and New York Academic Press 1974
- 5) J. Boime, E.E. Smith, F.E. Hunter jr.
"Stability of Oxidative Phosphorylation and Structural Changes of
Mitochondria in Ischemic Rat Liver"
Arch. of Biochem. and Biophys. 128 , 704-715 (1968)
- 6) S. Mitnacht jr., S.C. Sherman, J.L. Farber
"Reversal of Ischemic Mitochondrial Dysfunction"
Journal of Biol. Chem. 254 , 19
pp. 9871-9878 (1979)

- 7) R.S. Rhodes, R.G. DePalma, R.L. Druet
 "Reversibility of Ischemically Induced Mitochondrial Dysfunction
 with Reperfusion"
 Surgery, Gynecology and Obstetrics 145 , 719-724 (1977)

- 8) J. Boime, E.E. Smith, F.E. Hunter jr.
 "The Role of Fatty Acids in Mitochondrial Changes During Liver Ischemia"
 Arch. of Biochem. and Biophys. 139 , 425-443 (1970)

- 9) A.E. Baue, M.M. Sayeed
 "Alterations in the functional capacity of mitochondria in hemorrhagic
 shock"
 Surgery 68 , 40-47 (1970)

- 10) L. Mela, L. v.Bacalzo jr., L.D. Miller
 "Defective oxidative metabolism of rat liver mitochondria in
 hemorrhagic and endotoxin shock"
 American Journal of Physiology 220 , 571-577 (1971)

- 11) A.M. Daniel, J.-G. Beaudoin
 "Evaluation of Mitochondrial Function in the Ischemic Rat Liver"
 Journal of Surgical Research 17 , 19-25 (1974)

- 12) D.A. Hems, J.T. Brosnan
 "Effects of Ischemia on Content of Metabolites in Rat Liver and
 Kidney in vivo"
 Biochem. Journal 120 , 105-111 (1970)

- 13) K.R. Chien, J. Abrams, A. Serroni, J.T. Martin, J.L. Farber
 "Accelerated Phospholipid Degradation and Associated Membrane
 Dysfunction in Irreversible, Ischemic Liver Cell Injury"
 Journal of Biol. Chem. 253 , 4809-4817 (1978)

- 14) C.D. Berdanier, S. McNamara
"Aging and Mitochondrial Activity in BHE and Wistar Strains of Rats"
Exp. Geront. 15 , 519-525 (1980)
- 15) B. Chance, G.R. Williams
"Respiratory Enzymes in Oxidative Phosphorylation: III The steady State"
Journal of Biol. Chem. 217 , 409-427 (1955)
- 16) Y. Kamiyama, K. Ozawa, J. Honjo
"Changes in Mitochondrial Phosphorylative Activity and Adenylate Energy Charge of Regenerating Rabbit Liver"
Journal of Biochem. 80 , 875-881 (1976)
- 17) W.C. Schneider
"Intracellular Distribution of Enzymes"
Journal of Biol. Chem. 176 , 259-276 (1948)
- 18) C. Cooper, A.L. Lehninger
"Oxidative Phosphorylation by an Enzyme Complex from Extracts of Mitochondria"
Journal of Biol. Chem. 219 , 489-506 (1956)
- 19) T.E. Weichselbaum
"An Accurate and Rapid Method for the Determination of Proteins in Small Amounts of Blood Serum and Plasma"
American Journal of Clinical Pathology (Techn. Sec.) 10 , 40-49 (1946)
- 20) G.A. Truesdale, A.L. Downing
"Solubility of Oxygen in Water"
Nature 173 , 1236 (1954)

- 21) J.B. Clark, W.J. Nicklas
 "The Metabolism of Rat Brain Mitochondria"
 Journal of Biol. Chem. 245 , Nr. 18 4724-4731 (1970)

- 22) H.A. Harper et al.
 "Physiologische Chemie"
 Berlin, Heidelberg, New York : Springer-Verlag 1975 S. 271

- 23) A.L. Lehninger
 "Biochemie"
 Verlag Chemie 1977 S. 407

- 24) H. Adam in H.U. Bergmeyer
 "Methoden der enzymatischen Analyse"
 Verlag Chemie 1.Auflage 1962 S. 577

- 25) M. Klingenberg in H.U. Bergmeyer
 "Methoden der enzymatischen Analyse"
 Verlag Chemie 2.Auflage 1970 S. 1979

- 26) E. Kreyszig
 "Statistische Methoden und ihre Anwendung"
 Vandenhoeck und Ruprecht 1974 238-242

- 27) A. Lindner
 "Handliche Sammlung math.-stat. Tafeln"
 Birkhäuser-Verlag Basel/Stuttgart 1961

- 28) P.B. Herdson, J.P. Laktenbach, R.B. Jennings
 Federation Proc. 27 (Abstr. No. 8042) 357 (1968)

- 29) W.J. Mergner, L. Marzella, C. Mergner, M.W. Kahng, M.W. Smith, B.F. Trump
 "Studies on the Pathogenesis of Ischemic Cell Injury VII Proton Gradient and Respiration of Renal Tissue Cubes, Renal Mitochondrial and Submitochondrial Particles Following Ischemic Cell Injury"
 Beitr. Path. 161 , 230-243 (1977)
- 30) B.P. Yip, H.A. Lardy
 "The Role of Calcium in the Stimulation of Glucogenesis by Catecholamines"
 Arch. of Biochem. and Biophys. 212 No.2 , 370-377 (1981)
- 31) L. Wojtczack, H. Zaluska
 "The Inhibition of Translocation of Adenine Nucleotides through Mitochondrial Membranes by Oleate"
 Biochem. and Biophys. Research Comm. 28 No.1 , 76-81 (1967)
- 32) A.L. Lehninger
 "Biochemie"
 Verlag Chemie 1977 S. 440
- 33) C.S. Rossi, A.L. Lehninger
 "Stoichiometry of Respiratory Stimulation, Accumulation of Ca^{2+} and Phosphate, and Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Mitochondria"
 Journal of Biol. Chem. 239 No.11 , 3971-3980 (1964)

Die vorliegende Arbeit wurde am Physiologisch-Chemischen Institut, Lehrstuhl II , der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.med. K. Brand durchgeführt.

Herrn Prof.Dr.med. K. Brand danke ich für die Überlassung des Themas, für die methodische Einarbeitung und für die stetige Betreuung bei der Durchführung und Auswertung der Versuche.

Ferner möchte ich mich bei Frau Christa Ostermann und allen Mitarbeitern des Instituts für die stets freundliche und geduldige Unterstützung bedanken.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Dipl.Math. C. Duhme vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für die Beratung bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse.

Lebenslauf

Am 24. Februar 1958 wurde ich als zweiter Sohn des Verwaltungsangestellten Friedrich Baumann und seiner Ehefrau Ottilie, geb. Bonni, in Erlangen geboren.

Von 1964-1968 besuchte ich die Grundschule in Erlangen. Anschließend absolvierte ich das mathematisch-naturwissenschaftliche Ohm-Gymnasium in Erlangen, wo ich 1977 das Abitur ablegte.

Im Wintersemester 1977/1978 immatrikulierte ich mich an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg für das Fach Biologie. Im Sommersemester 1978 schrieb ich mich für das Fach Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg ein und legte nach dem 4. Fachsemester am 18. März 1980 die ärztliche Vorprüfung mit Erfolg ab.

Am 26. März 1981 bestand ich den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Im August 1981 begann ich mit der vorliegenden Arbeit.

Am 7. April 1983 legte ich den zweiten Teil der ärztlichen Prüfung mit Erfolg ab.

Am 11. April 1984 bestand ich den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Druck: Copy Center 2000
Obere Karlstraße 30
8520 Erlangen